GENETIK DES EISEN (III) AEROBACTIN-SYSTEMS VON ESCHERICHIA COLI

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE

der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von

ROY GROSS

aus Mietingen

1985

GENETIK DES EISEN (III) AEROBACTIN-SYSTEMS VON ESCHERICHIA COLI

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE

der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von

ROY GROSS

aus Mietingen

1985

Tag der mündlichen Prüfung:	1. August 1985
Dekan:	Professor Dr. H.U. Seitz
1. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Braun
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. K. Hantke

Meinen Eltern

Rita und Johannes Gross

gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Volkmar Braun am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die vielen hilfreichen Gespräche und die großzügige Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Braun herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Priv. Doz. Dr. K. Hantke für die vielen Ratschläge, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Besonders erwähnen möchte ich auch die hervorragende Zusammenarbeit mit meinem Kollegen Fred Engelbrecht, und die vielen anregenden Diskussionen mit Dr. Luitgard Zimmermann und Dr. Rudolf Schneider.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II möchte ich für die gute Zusammenarbeit und für die angenehme Atmosphäre danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei der Friedrich-Naumann-Stiftung für die großzügige Förderung meiner Arbeit bedanken, insbesondere schulde ich Herrn Prof. Dr. Klaus Scholder Dank für sein verständnisvolles Eintreten für meine Anliegen.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Bedeutung des Eisens	1
1.2.	Die Eisenversorgung bei E. coli	2
1.3.	Eisen und Virulenz	6
1.4.	Ziel der Arbeit	8
2.	MATERIAL und METHODEN	9
2.1.	Chemikalien	9
2.2.	Nährmedien	11
2.3.	Bakterienstämme	13
2.4.	Restriktionskarten der benutzten Plasmidvektoren und Transposons	15
2.5.	Wachstumsbedingungen	18
2.6.	Produktion von Colicin V	18
2.7.	Isolierung von Cloacin DF13	19
2.8.	Test auf Sensitivität gegen Cloacin DF13	19
2.9.	Test zur Überprüfung der Aerobactin-synthese durch Kreuzfütterung	19
2.10.	Chemischer Nachweis von Aerobactin und seinen Vorstufen	20
2.10.1.	Bestimmung von Nitrit in Kulturüberständen	20
2.10.2.	Bestimmung von 6-N-Hydroxylysin in Kulturüberständen	21
2.10.3.	Bestimmung von Hydroxamsäuren in Kulturüberständen	21
2.11.	Isolierung von Plasmiden	22
2.11.1.	Schnellmethode zum "Screening" von Plasmiden	22
2.11.2.	Präparative Schnellmethode	23
2.11.3.	Isolierung von ColV Plasmiden durch Dichtegradientenzentrifugation	25

		Seite
2.12.	Isolierung von λCI_{857}Sam7 DNA	26
2.13.	Bestimmung von DNA Konzentrationen	27
2.14.	Bedingungen für die DNA Spaltung mit Restriktionsenzymen	28
2.15.	Bedingungen für die Nuklease Bal31	29
2.16.	Bedingungen für die Ligation von DNA	29
2.17.	Transformation mit Plasmid DNA	30
2.18.	Konjugation	31
2.19.	Mutagenese mit Tn1000	31
2.20.	Mutagenese mit Mud1(Ap,lac)	32
2.20.1.	Herstellung des Mud1-Lysats	32
2.20.2.	Mutagenese mit Mud1	32
2.21.	Agarosegelelektrophorese	33
2.22.	Molekulargewichtsbestimmung von Restriktionsfragmenten	34
2.23.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	34
2.24.	Expression plasmidcodierter Proteine im Minizellsystem	35
2.25.	Polyacrylamidgelelektrophorese	36
2.26.	Autoradiographie	37
2.27.	Untersuchung von DNA-DNA-Homologien	37
2.27.1.	Nick-Translation	37
2.27.2.	Southern Blot	38
2.27.3.	DNA-DNA-Hybridisierung	39
3.	ERGEBNISSE	41
3.1.	Genetische Charakterisierung von pColV-K311/11 und von Mutanten im Aerobactin-system	41
3.1.1.	Physiologische Eigenschaften der Mutanten	41
3.1.2.	Restriktionsanalyse der Insertions- und Deletionsplasmide	43
3.2.	Klonierung der Aerobactinregion von pColV-K311/11	49

		Seite
3.2.1.	Klonierung der Aerobactin Synthese- und Transportregion	49
3.2.2.	Subklonierung der Aerobactin Syntheseregion	50
3.2.3.	Mutagenisierung des Syntheseklons pRG12	54
3.2.3.1.	Mutagenese mit Tn1000	54
3.2.3.1.1.	Eigenschaften der Tn1000 Insertionsderivate von pRG12	55
3.2.3.2.	Mutagenese von pRG12 durch Spaltung mit Restriktionsenzymen	57
3.2.3.2.1.	Eigenschaften der mit Restriktionsenzymen erzeugten Derivate von pRG12	58
3.2.3.2.2.	Komplementationsversuche mit pRG12 Derivaten	63
3.2.4.	Identifizierung der plasmidcodierten Proteine im Minizellsystem	66
3.2.4.1.	Korrelation von Genfunktion, Genlocus und Genprodukt	68
3.2.5.	Konstruktion weiterer pRG12 Derivate durch Mutagenese mit Bal31 und durch Umklonierung in den Expressionsvektor pUC9	72
3.2.5.1.	Eigenschaften der mit Bal31 und durch Umklonierung erzeugten Derivate von pRG12 und Komplementationsstudien mit diesen Plasmiden	75
3.2.5.2.	Analyse der mit Bal31 mutagenisierten pRG12 Derivate im Minizellsystem	79
4.	DISKUSSION	83
4.1.	Restriktionsanalyse von pColV-K311/11 und seinen Derivaten	83
4.2.	Klonierung der Aerobactinregion von von pColV-K311/11 und Feinanalyse der Syntheseregion	85

		Seite
4.2.1.	Klonierung der Aerobactinregion	85
4.2.2.	Feinanalyse der Aerobactinsynthese-region	86
5.	ZUSAMMENFASSUNG	91
6.	ANHANG	93
	Untersuchung von verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den eisenregulierten äußeren Membranproteinen Iut, FhuA und FhuE	93
7.	LITERATUR	95

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
Cm	Chloramphenicol
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
deion.	deionisiert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraacetat, Na-Salz
EGTA	Äthylenglycol-bis(ß-Aminoäthyläther) N,N,N`,N`-Tetraessigsäure
Kb	Kilobasen
Kd	Kilodalton
Min.	Minuten
MOPS	Morpholinopropanylsulfonsäure
NB	Nutrient Broth
NBD	Nutrient Broth mit 200 µM Dipyridyl
OD_x	optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyäthylenglykol
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec.	Sekunden
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TMED	N,N,N`,N`-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TY	Tryptone Yeast
upm	Umdrehungen pro Minute

1. EINLEITUNG

1.1. Bedeutung des Eisens

Das Redoxpotential des Eisens umfaßt einen Bereich von +300 mV bei Cytochromen vom a-Typ bis zu -500 mV bei einigen Eisen-Schwefel-Proteinen. Wegen dieser großen Variabilität seines Redoxbereiches ist Eisen an sehr vielen Redoxreaktionen beteiligt, und nahezu alle Lebewesen, mit Ausnahme der Milchsäurebakterien, benötigen Eisen zum Wachstum.

Der Nutzung dieses für die Lebewesen essentiellen Elementes stehen aber große Schwierigkeiten bei der Beschaffung entgegen. Eisen liegt nämlich unter oxidierenden Bedingungen bei neutralem pH-Wert in der Eisen(III)-Form vor, die sehr stark zur Bildung von schwerlöslichen Eisen(III)-Hydroxy-Aquo-Komplexen mit einer Dissoziationskonstanten von 10^{-38} Mol/l neigt (86). Die freie Eisen(III)-Konzentration liegt deshalb viele Größenordnungen unter der für das Wachstum von Mikroorganismen nötigen Minimalkonzentration von 0,1-1 µM, nämlich bei 10^{-12} µM.

Offensichtlich gelingt es den Lebewesen aber, sich trotz dieser Schwierigkeit mit ausreichend Eisen zu versorgen; so enthält z.B. jede einzelne Bakterienzelle etwa 10^5-10^6 Eisenionen (1).

Die meisten Lebewesen haben das Problem auf eine ähnliche Weise gelöst: Es wird ein Eisenkomplexbildner synthetisiert und ins umgebende Medium abgegeben, wo er das Eisen in eine lösliche Form überführt. Der Eisen(III)-Chelatorkomplex wird dann über spezifische Membrankomponenten in die Zellen transportiert, wo das Eisen freigesetzt, reduziert und in Biomoleküle eingebaut wird.

1.2. Die Eisenversorgung bei Escherichia coli

Bei E. coli sind bislang außer einem System niedriger Affinität fünf hochaffine Eisenaufnahmesysteme bekannt, ein Aufwand, der für sich allein schon zeigt, welch zentrale Bedeutung der Eisenversorgung zukommt. Allen Systemen gemeinsam ist die Notwendigkeit eines für den jeweiligen Komplexbildner hochspezifischen Rezeptorproteins in der äußeren Membran (14,73).

Die meisten Enterobakterien synthetisieren unter eisenarmen Bedingungen einen Eisenkomplexbildner vom Phenolsäure-Typ, das Enterochelin, ein cyclischer Ester aus drei 2,3-Dihydroxybenzoyl-Serinresten. Es ist der Eisenkomplexbildner mit der größten Affinität zu Eisen von allen bislang bekannten Eisenkomplexbildnern. Für die Synthese des Moleküls sind wahrscheinlich sieben Gene nötig (21, 30,79). Zum Transport von Ferri-Enterochelin ist ein Rezeptorprotein in der äußeren Membran, das FepA Protein, nötig (Abb. 1), das zugleich auch der Rezeptor für Colicin B ist (54,68,80). Der weitere Transport durch die Cytoplasmamembran wird durch das fepB Gen vermittelt (30,101). Zur Eisenfreisetzung in der Zelle muß Enterochelin zerstört werden. Hierbei ist das fesB Genprodukt, vermutlich eine spezifische Esterase, beteiligt (34).

Ein weiteres hochaffines Eisenaufnahmesystem kann Ferri-Dicitrat zur Eisenversorgung nutzen (31). Auch hier ist wieder ein spezifisches Rezeptorprotein in der äußeren Membran, das FecA Protein, nötig (Abb. 1) (43). Ein weiteres Gen fecB codiert für eine Funktion, die für den Transport durch die Cytoplasmamembran gebraucht wird (92). Die Besonderheit dieses Transportsystems liegt darin, daß zu seiner Induktion nicht nur Eisenmangel herrschen, son-

dern auch Citrat im Medium vorhanden sein muß (53,102).

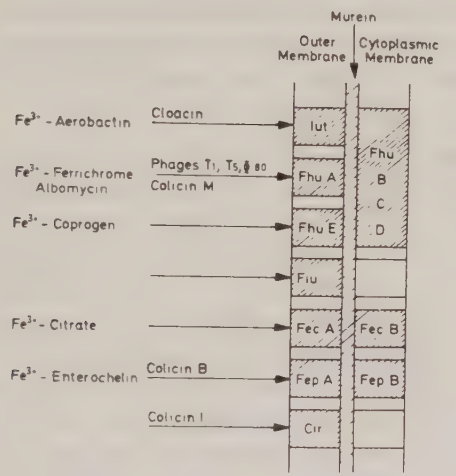


Abb. 1: Schematische Darstellung der am Eisentransport beteiligten Membrankomponenten von E. coli

Die drei übrigen bislang bekannten Eisentransportsysteme benutzen Komplexbildner des Hydroxamsäure-Typs. Diese drei Systeme haben einen gemeinsamen Weg durch die Cytoplasmamembran, für den die Gene fhuBCD nötig sind (12,15,28, 45,100). Spezifisch hingegen ist bei jedem der drei Systeme wieder der Rezeptor in der äußeren Membran.

Für den Komplexbildner Ferrichrom, der nicht von E. coli selbst, sondern von dem Pilz Ustilago sphaerogena synthetisiert wird, ist der Rezeptor in der äußeren Membran das FhuA Protein (Abb. 1), das auch dem strukturanalogen Antibiotikum Albomycin, dem Colicin M und den Phagen T1, T5 und Ø80 als Rezeptor dient (16,47,50,56,95,96,100). Ferrichrom wird bei der Aufnahme in die Zelle durch Acetylierung

einer seiner Eisenbindungsstellen inaktiviert und ins Medium freigesetzt (84).

Das FhuE Protein (Abb. 1) der äußeren Membran dient einem weiteren hochaffinen Eisenaufnahmesystem mit dem Eisenkomplexbildner Coprogen, der ebenfalls von Pilzen synthetisiert wird, als Rezeptor (45).

Das fünfte hochaffine Eisenversorgungssystem soll ausführlicher vorgestellt werden, da es Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist. Dieses System ist unter den Enterobakterien und vor allem unter den Krankheitserregern dieser Familie weit verbreitet. Es konnte bei Aerobacter aerogenes (33), Enterobacter cloacae (89), Shigella flexneri (76/77), Shigella boydii, Shigella sonnei (62), Arizona, Salmonella (22,67) und bei vielen natürlichen und klinischen Isolaten von E. coli (3,88) nachgewiesen werden. Diese weite Verbreitung des Systems ist nicht verwunderlich, da das System meist auf konjugativen Plasmiden, bei E. coli auf ColV Plasmiden (87,98,99), lokalisiert ist. Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, daß der Aerobactinbereich bei den plasmidcodierten Systemen von E. coli (67,78) und von Salmonella (22) von zwei invers angeordneten IS1 Elementen eingerahmt wird, sodaß eine Transposonstruktur angenommen werden kann. Unter Eisenmangelbedingungen produzieren Stämme mit diesem System den Komplexbildner Aerobactin (9,94). Aerobactin besteht aus einem Citrat-Lysin-Gerüst (Abb. 2), wobei die 6-Aminofunktionen der beiden Lysinreste zu Hydroxamsäurefunktionen umgesetzt sind, die an der Komplexierung des Eisens beteiligt sind (33,49). Mehrere Gene sind an der Synthese des Moleküls beteiligt (72,75). Bei den von ColV Plasmiden codierten Systemen von E. coli konnte gezeigt werden, daß sowohl die Synthese des Aero-

bactins als auch eine Transportfunktion plasmidcodiert sind (99). Als Rezeptorprotein in der äußeren Membran wurde das plasmidcodierte 74 Kd große Iut Protein (Abb. 1) identifiziert, das zugleich auch der Rezeptor für das Bacteriocin Cloacin DF13 ist (2,35,90).

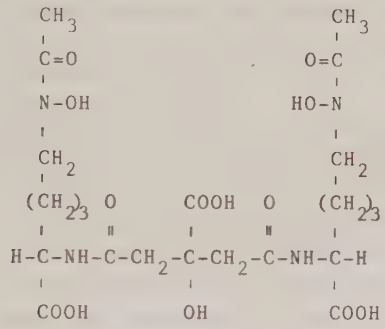


Abb. 2: Struktur von Aerobactin

Allen bisher beschriebenen Eisentransportsystemen gemeinsam ist die Notwendigkeit der tonB Funktion (32,42) und der exbB Funktion (48).

Alle Eisenversorgungssysteme, auch das plasmidcodierte Aerobactinsystem (11), unterliegen einer vermutlich negativen Regulation durch das fur Genprodukt (44,46). Unter Eisenmangelbedingungen werden die Gene des fur-Regulons, zur Zeit sind etwa 30 Gene bekannt, dereprimiert.

In Abb. 1 sind noch zwei weitere äußere Membranproteine namens Fiu und Cir eingezeichnet, die ebenfalls unter eisenarmen Bedingungen induziert werden. Diesen Proteinen konnte bislang noch keine Eisentransportfunktion zugewiesen werden.

1.3. Eisen und Virulenz

Der Besitz von hochaffinen Eisenversorgungssystemen ist für pathogene Keime von besonderer Bedeutung und stellt neben anderen Pathogenitätsfaktoren, wie der Fähigkeit sich an Schleimhäute anheften zu können, der Toxinbildung, der Hämolysinbildung oder der Resistenz gegen die bakteriziden Effekte des Serums (5,6), einen weiteren wichtigen Faktor für deren Virulenz dar (29,36,98).

Im Körper eines Säugers stehen die pathogenen Keime einer Vielzahl von Abwehrmechanismen seitens des Wirtes gegenüber, die es zu umgehen gilt. Diese Abwehrmechanismen reichen von einfachen mechanischen Maßnahmen, wie einer verstärkten Schleimabsonderung, über chemische Maßnahmen, wie saurer pH-Wert oder Lysozymwirkung, bis hin zur Bakterienabwehr durch Phagozytose und zur Abwehr über spezifische zelluläre und humorale Immunreaktionen durch Antikörper und Komplementsystem. Hinzu kommt, daß im Säuger eine extreme Armut an freiem Eisen herrscht, denn Eisen ist hier an Trägerproteine wie das Laktoferrin in sekretorischen Flüssigkeiten und an Transferrin im Blutserum oder aber intrazellulär an Hämoglobin bzw. an das Eisenspeicherprotein Ferritin gebunden. Die Bedeutung dieser Eisenarmut als ein Hauptgrund für die bakteriostatische Wirkung des Serums ist durch viele Tierversuche belegt worden. Eine krankhafte Erhöhung des Bluteisenspiegels erhöht auch die Infektionsgefahr durch Bakterien und Pilze. Als eine weitere unspezifische Abwehrmaßnahme reagiert der Körper außerdem mit einer zusätzlichen Verknappung des Eisens. Dies kann entweder lokal an einer entzündeten Region durch Freisetzung von Laktoferrin aus Leukozyten geschehen, oder auch als eine generelle Ver-

knappung des Bluteisenspiegels. Vermutlich wird hierfür Laktoferrin im Blut freigesetzt, das dem Transferrin Eisen entzieht und dann intrazellulären Speichern zuführt. Außerdem wird weniger aus dem Hämoglobin stammendes Eisen aus dem reticuloendothelialen System an Transferrin abgegeben (37 ,64,97). Auch aus dem Darm wird bei einer Infektion weniger Eisen aufgenommen.
Um sich in einem Säuger dennoch vermehren zu können, müssen sich die Mikroorganismen das Eisen von diesen Eisenbindeproteinen des Säugers holen. Yersinia kann freies Hämoglobin als Eisenquelle nutzen. Meistens wird aber dem Transferrin das Eisen entzogen, was entweder direkt erfolgen kann, wie bei den Meningokokken, oder aber unter Zuhilfenahme von Eisenkomplexbildnern.

Beide von E. coli synthetisierten Eisenkomplexbildner, das Enterochelin und das Aerobactin, sind in der Lage, dem Transferrin das Eisen zu entziehen. Doch zeigt sich, daß Aerobactin trotz seiner viel geringeren Affinität zu Eisen dem Enterochelin im Serum überlegen ist (57). Die hohe Anzahl von klinischen Isolaten (3,88), die das Aerobactinsystem besitzen, deutet ebenfalls darauf hin, daß dieser Komplexbildner vom Hydroxamsäure-Typ eine große Bedeutung für die pathogenen Keime hat. Wachstumsversuche im Serum belegen, daß das Vermögen, sich gut im Serum vermehren zu können, vom Aerobactinsystem, nicht aber vom Enterochelinsystem abhängt (10).

Es gibt sicherlich mehrere Gründe dafür, warum die Hydroxamsäureverbindung der Phenolsäureverbindung im Serum überlegen ist:
Enterochlin ist schlecht wasserlöslich, leicht hydrolytisch spaltbar und sehr oxidationsempfindlich. Aerobactin ist ein gut wasserlösliches, sehr stabiles Molekül. Enterochelin kann möglicherweise durch hydrophobe Bindung

an Serumproteine wie das Albumin "inaktiviert" werden (58), zudem wurden im normalen menschlichen Serum Antikörper der IgA-Klasse gegen Enterochelin gefunden, die den Transport von Enterochelin oder auch bereits die Freisetzung von Enterochelin beeinträchtigen (70,71). Enterochelin muß also als Hapten wirken können, Aerobactin hingegen scheint weniger immunogen zu sein.
Enterochelin wird bei der Eisenfreisetzung zerstört und kann deshalb nur einmal zum Transport von Eisen eingesetzt werden. Aerobactin kann mehrfach beim Eisentransport benutzt werden (10).
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Hydroxamsäureverbindung Aerobactin der Phenolsäureverbindung Enterochelin im Blutserum überlegen ist, und der Besitz des Aerobactinsystems zur Virulenz von invasiven Keimen beiträgt.

1.4. Ziel der Arbeit

Die Aerobactinregion des Plasmides ColV-K311/11 sollte durch Restriktionsanalyse von Insertions- und Deletionsmutanten lokalisiert und kartiert werden.
Durch Klonierung der Genregion sollte eine Feinanalyse des Systems durchgeführt werden mit dem Schwerpunkt, die Synthese von Aerobactin zu untersuchen, die hierfür nötigen Gene zu charakterisieren und deren Genprodukte zu identifizieren.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1. Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien sind analysenreine Reagenzien der Firma Merck AG, Darmstadt.

Acrylamid	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Agarose	Bethesda Research Laboratories, Rockville, USA
Albumin aus Rinderserum	Serva, s.o.
Ammoniumpersulfat	Serva, s.o.
Ampicillin	Serva, s.o.
Amplify	Amersham Buchler GmbH&Co KG, Braunschweig
ATP	Boehringer GmbH, Mannheim
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Brij 58	Serva, s.o.
Chloramphenicol	Serva, s.o.
Cycloserin	Fluka Feinchemikalien GmbH, Ulm
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Boehringer, s.o.
DNase I aus Rinderpankreas	Sigma Chemie GmbH, München
DNA Polymerase I	Boehringer, s.o.
EGTA	Sigma, s.o.
Ethidiumbromid	Sigma, s.o.
Ficoll 400	Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg
Heringssperma DNA	Boehringer, s.o.
Lysozym	Boehringer, s.o.
2-Mercaptoäthanol	Serva, s.o.

N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, s.o.
Mitomycin C	Sigma, s.o.
Neomycin	Serva, s.o.
Nuclease Bal31	Boehringer, s.o.
Nutrient Broth	Difco, s.o.
PEG 6000	Serva, s.o.
Proteinase K	Boehringer, s.o.
Qickszint 402	W. Zinsser KG, Frankfurt
Restriktionsenzyme	Boehringer, s.o.
RNase	Boehringer, s.o.
SDS	Serva, s.o.
Sephadex G50 Superfine	Pharmacia, s.o.
Serva Blau G	Serva, s.o.
Spectinomycin	Serva, s.o.
Streptomycinsulfat	Serva, s.o.
T4-DNA-Ligase	Boehringer, s.o.
T4-DNA-Ligase, hochkonz.	Serva, s.o.
Tetracyclin	Sigma, s.o.
TMED	Serva, s.o.
Tris	C. Roth, Karlsruhe
Yeast Extract	Difco, s.o.

Die Radiochemikalien waren von Amersham Buchler, Braunschweig.
Aerobactin war aus Beständen des Instituts.

2.2. Nährmedien

TY-Medium:	Bacto Tryptone	8 g
	Yeast Extract	5 g
	NaCl	5 g

Mit deion. Wasser auf 1 l auffüllen

NB-Medium:	Nutrient Broth	8 g
	NaCl	5 g

Mit deion. Wasser auf 1 l auffüllen

M9-Salze:	$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	7,5 g
	KH_2PO_4	3,0 g
	NaCl	0,5 g
	NH_4Cl	1,0 g

Mit deion. Wasser auf 1 l auffüllen

M9-Medium:	M9-Salzlösung	90 ml
	Glukoselösung (40%)	1 ml
	Thiaminlösung (1mg/ml)	1 ml
	$MgSO_4$-Lösung (1M)	0,1 ml
	$CaCl_2$-Lösung (0,1M)	0,1 ml
	Deion. Wasser	7,8 ml

M56-Medium:	KH_2PO_4	13,6 g
	$(NH_4)_2SO_4$	2,0 g
	$MgSO_4 \times H_2O$	0,2 g
	$CaCl_2$	0,01 g
	$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,5 mg
	Glukose (40%)	10 ml

Mit KOH pH 7,0 einstellen und mit deion. Wasser auf 1 l auffüllen.

Zur Bestimmung von Aerobactin und dessen Vorstufen wurde $FeSO_4$ weggelassen. Stattdessen wurden 10 ml einer Shikimisäurelösung (10 mg/ml) zugegeben.

Zur Herstellung der jeweiligen Nährplatten wurde 15 g/l Agar zugegeben.
Zur Herstellung von Top-Agar wurde 7,5 g/l Agar zugegeben.

Sollten die Vollmedien eisenverarmt werden (z.B. NBD-Medium), wurden 200 µM Dipyridyl zugegeben.

Verwendete Antibiotikakonzentrationen:

Ampicillin	25 µg/ml
Chloramphenicol	50 µg/ml
Neomycin	30 µg/ml
Spectinomycin	100 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Tetracyclin	15 µg/ml

2.3. Bakterienstämme

Stamm	genetische Merkmale	Herkunft	Stammslg. Uni Tübingen
E. coli			
K311/11	Wildtyp, *aroB* pCol*V*-K311/11	dieses Institut	661
K311/1107	wie K311/11, aber *aer* pCol*V*-K311/11::Mud1	dieses Institut	669
TK12	wie K311/11, aber *aer iut* pCol*V*-TK12	dieses Institut	635
E. coli K-12			
AB2847	$F^{+1)}$ *aroB thi tsx malT*	dieses Institut	86
H1443	F^- *aroB lac araD rpsL*	K. Hantke	1443
EN75	wie H1443, aber *rpsE*	F. Engelbrecht	949
W3110	Wildtyp, aber λCI_{857}Sam7	dieses Institut	497
HB101	*recA leu pro* r^-m^-	J. Collins	396
H1129	*thr lac rpsL thi fhuA aroB*	K. Hantke	1129
DS410	*lacY rpsL xyl thi mtl minA minB*	dieses Institut	500
MAL103	*araD lac proAB rpsL* Mu *cts* Mud1(Ap,*lac*)	M. Casadaban	442
EN775	wie H1443, aber pCol*V*-K311/11::Tn*10*	F. Engelbrecht	775
WO916	wie EN775, aber *mal lamB aer* pCol*V*-EN775::Tn*5*	H. Wolff	916
EN41	wie EN775, aber *aer*	F. Engelbrecht	963
ZI346	wie EN775, aber *fepA aer* pCol*V*-EN775::Mud1	L. Zimmermann	2027
ZI347	wie EN775, aber *fepA iut* pCol*V*-EN775::Mud1	L. Zimmermann	2028
ZI349	wie EN775, aber *fepA*, pCol*V*-EN775::Mud1	L. Zimmermann	2030

1) liegt kryptischvor, da F nur sehr schlecht isolierbar ist (38)

Stamm	genetische Merkmale	Herkunft	Stammslg. Uni Tübingen
E. coli K-12			
ZI350	wie EN775, aber fepA aer pCo1V-EN775::Mud1	L. Zimmermann	2031
CR63	Wildtyp, F^+	dieses Institut	30
GR1	wie HB101, aber pRG1	diese Arbeit	
GR24	wie H1129, aber pRG1	diese Arbeit	
GR19	wie WO916, aber pRG12	diese Arbeit	
GR21	wie H1443, aber pRG12	diese Arbeit	
GR30	wie CR63, aber pRG12	diese Arbeit	
H1626	wie H1443, aber fhuE pKH1	K. Hantke	1126
M51-I	wie DS410, aber recA fhuA pFB103-1	L. Fecker	
Enterobacter cloacae			
S458	Wildtyp, pClo DF13	B. Oudega	607

2.4. Restriktionskarten der benutzten Plasmidvektoren und Transposons

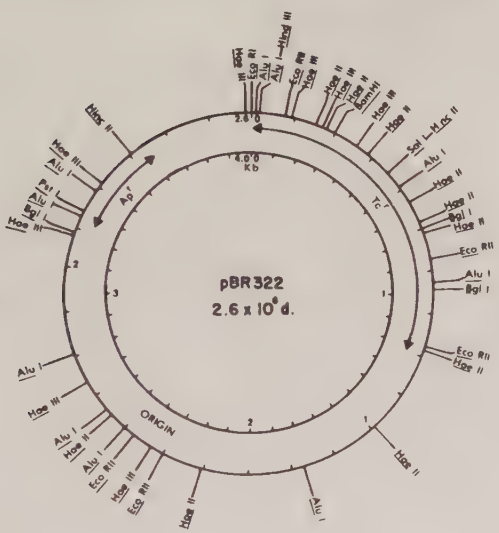


Abb. 3: Restriktionskarte von pBR322 (8)

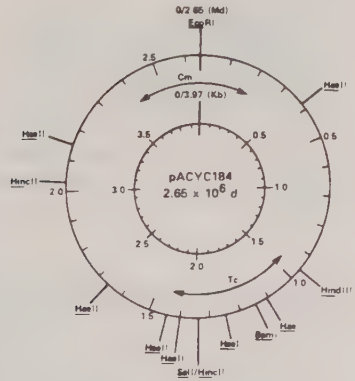


Abb. 4: Restriktionskarte von pACYC184 (19)

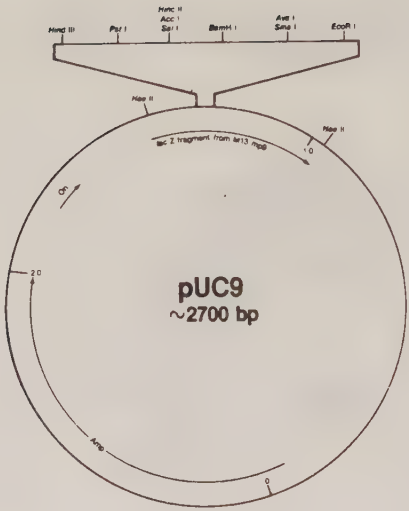


Abb. 5: Restriktionskarte von pUC9 (91)

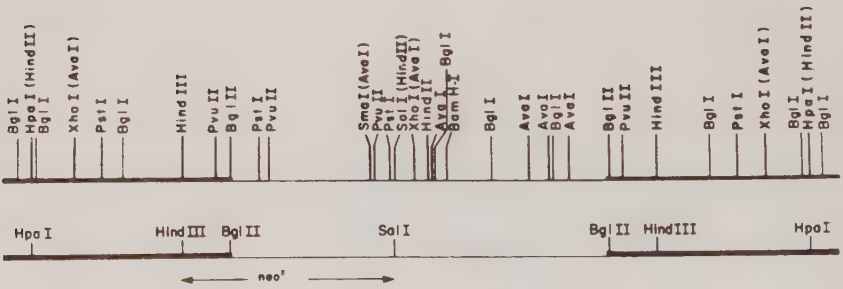


Abb. 6: Restriktionskarte des Transposons Tn5 (82)

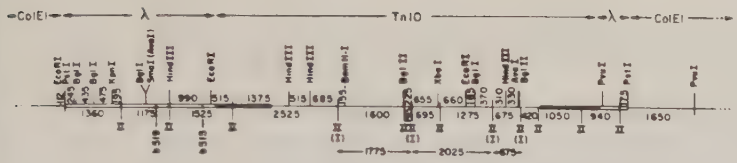


Abb. 7: Restriktionskarte des Transposons Tn10 (55)

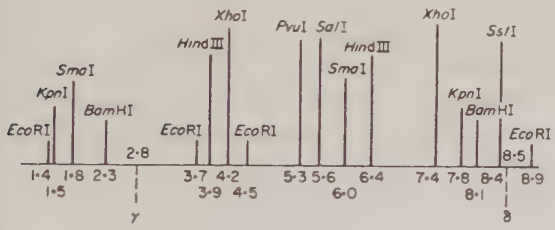


Abb. 8: Restriktionskarte des Transposons Tn1000 (40)

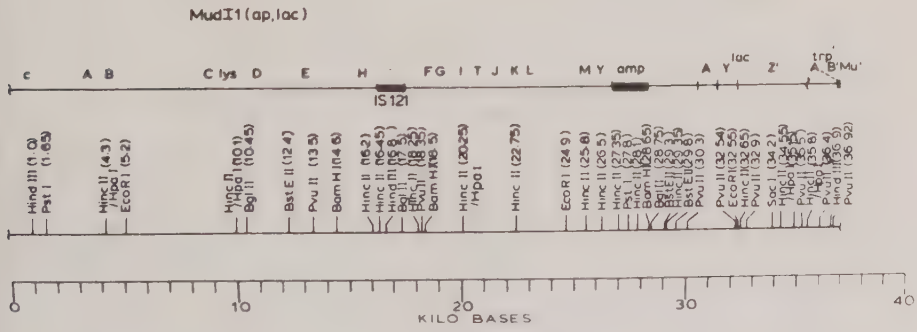


Abb. 9: Restiktionskarte von MudI(Ap,lac) (74)

2.5. Wachstumsbedingungen

Für die Vorkultur wurden die Zellen von Einzelkolonien auf TY-Platten ausgehend in 10 ml TY-Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane über Nacht bei 37°C bei guter Belüftung vorgezüchtet. Stämme mit temperaturinduzierbaren lysogenen Phagen wurden entsprechend bei 27°C angezogen. Ausgehend von diesen Vorkulturen wurden dann die Hauptkulturen zu einer OD_{578} von 0,05 angeimpft. Die Hauptkulturen wurden je nach Versuchsbedingungen in unterschiedlichen Wachstumsphasen geerntet. Für die Isolierung von ColV Plasmiden wurden die Zellen in der späten log-Phase geerntet, zur Isolierung von Minizellen wie auch zur Bestimmung von Aerobactin und seinen Vorstufen wurden stationäre Kulturen genommen. Eine OD_{578} von 1,0 entspricht ungefähr einer Zelldichte von 10^9 Zellen/ml.

2.6. Produktion von Colicin V

Auf TY-Platten wurden die zu testenden Stämme punktförmig aufgeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C bzw. bei 27°C wurden die Zellen durch in Chloroform getränkte Filterpapierstreifen, die in die Petrischalen gelegt wurden, abgetötet. Nach 1 Std. wurden die Platten für eine weitere Stunde belüftet, um das Chloroform zu entfernen. Anschließend wurde mit 3 ml TY-Top-Agar, de 100 µl einer Übernachtkultur des Indikatorstammes AB2847 enthielt, überschichtet. Nach mehrstündiger Inkubation bei 37°C konnten um die Colicin V produzierenden Kolonien herum Hemmhöfe beobachtet werden.

2.7. Isolierung von Cloacin DF13 (26)

500 ml einer Übernachtkultur von Enterobacter cloacae (pClo DF13) wurden in 5 l TY-Medium in fünf 2 l Erlenmeyerkolben verteilt. Die Kulturen wurden bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 0,45 angezogen. Dann wurde 1 µg/ml Mitomycin C zugegeben und weiter inkubiert. Da der Stamm einen defekten Prophagen trägt, lysierten die Zellen durch die Induktion von Phagengenen durch das Mitomycin C. Die Zellyse dauerte etwa 3 Std. an. Danach wurden die nicht lysierten Zellen und die Zelltrümmer bei 4°C mit 23000 x g für 20 Min. abzentrifugiert. Zum Überstand wurden unter konstantem Rühren 36,5 g/ml Ammoniumsulfat zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Abzentrifugieren geerntet und in 50 ml 10 mM Phosphatpuffer, pH7,0 aufgenommen. Die Lösung wurde über Nacht bei 4°C gegen 5 l Phosphatpuffer dialysiert und anschließend sterilfiltriert. Das Cloacin DF13 haltige Filtrat wurde in kleinen Portionen bei -20 C aufbewahrt.

2.8. Test auf Sensitivität gegen Cloacin DF13

100 µl einer Übernachtkultur des zu testenden Stammes wurden in 3 ml TY-Topagar gegeben und auf eine TY-Platte gegossen. Nach dem Erstarren des Agars wurden verschiedene Verdünnungen von Cloacin DF13 aufgetropft. Bei sensitiven Stämmen waren an den Auftropfstellen Hemmzonen zu beobachten nach mehrstündiger Inkubation bei 37°C.

2.9. Test zur Überprüfung der Aerobactinsynthese durch Kreuzfütterung

100 µl des Indikatorstammes EN41, der in der Aerobactinbiosynthese defekt ist, Aerobactin aber noch transportie-

ren und verwerten kann, wurden in 3 ml NBD-Topagar auf NBD-Platten gegossen. Nach dem Erstarren des Agars wurden Filterplättchen aufgelegt, die zuvor mit 15 µl einer Übernachtkultur des zu testenden Stammes getränkt worden waren. Aerobactinproduzenten bildeten um die Filterrondellen herum einen Wachstumshof.

2.10. Chemischer Nachweis von Aerobactin und seinen Vorstufen (24)

Das Nachweisverfahren von Aerobactin und seinen Vorstufen beruht auf dem Nachweis von Hydroxylamin-Funktionen, aus denen durch Oxidation Nitrit freigesetzt wird, das dann in Gegenwart von Sulfanilsäure und α-Naphthylamin einen roten Farbstoff bildet, der photometrisch bei 520 nm gemessen werden kann.
Um aus Aerobactin und aus den Vorstufen mit der Hydroxamsäurefunktion Nitrit freisetzen zu können, muß vor der Oxidation bei saurem pH-Wert hydrolysiert werden.
Aus der Aerobactinvorstufe 6-N-Hydroxylysin kann Nitrit bereits ohne Hydrolyse nur durch Oxidation freigesetzt werden.
Zur Kontrolle muß der der Nitritgehalt der Probe ohne Hydrolyse und ohne Oxidation bestimmt werden.
Die in diesen Tests positiven Substanzen wurden von F. Engelbrecht mit synthetisch hergestellten Referenzsubstanzen dünnschichtchromatographisch oder durch Vergleich des Laufverhaltens im Aminosäureanalysator charakterisiert (27).

2.10.1. Bestimmung von Nitrit in Kulturüberständen

Der zu untersuchende Stamm wurde über Nacht in eisenarmem NBD-Medium oder in M56-Medium angezogen. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen mit 6000 x g bei 4°C für

10 Min. wurde 1 ml des Überstandes mit 0,5 ml Sulfanilsäurelösung (1% Sulfanilsäure in 25% Essigsäure) versetzt und dann 0,2 ml einer α-Naphthylaminlösung (0,6% α-Naphthylamin in 30% Essigsäure) zugegeben. War Nitrit vorhanden, entstand ein roter Farbstoff, der nach 30 Min. Inkubation bei Raumtemperatur bei 520 nm photometrisch bestimmt wurde.

2.10.2. Bestimmung von 6-N-Hydroxylysin in Kulturüberständen

Zur Freisetzung von Nitrit aus 6-N-Hydroxylysin mußte vor der Zugabe der α-Naphthylaminlösung eine Jod-Oxidation vorgenommen werden. Der mit Sulfanilsäure versetzte Kulturüberstand (2.10.1.) wurde hierzu mit 0,2 ml Jodlösung (1,3% Jod in Eisessig) versetzt und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges Jod wurde dann mit 0,2 ml einer Thiosulfatlösung (0,2 N Na-Thiosulfat) abgefangen. Anschließend wurden wieder 0,2 ml der α-Naphthylaminlösung zugegeben und der rote Farbstoff photometrisch bestimmt. Der eigentliche Nachweis von 6-N-Hydroxylysin wurde dann von F. Engelbrecht durch Vergleich des Laufverhaltens der in diesem Test positiven Substanz mit der synthetisch hergestellten Referenzsubstanz in Dünnschichtchromatographiesystemen durchgeführt (27).

2.10.3. Bestimmung von Hydroxamsäuren in Kulturüberständen

Es wurde wie bei 2.10.2. verfahren, nur daß vor der Zugabe der Sulfanilsäurelösung eine Hydrolyse durchgeführt wurde. Hierzu wurde 1 ml des Kulturüberstandes mit 0,2 ml 18 N H_2SO_4 versetzt und in ein Hydrolyseröhrchen einge-

schmolzen. Zur Hydrolyse wurde die Probe dann für 60 Min. bei 130°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde 1 ml einer 35% Na-Acetat-Lösung zugegeben. 1 ml dieses Hydrolysats wurde dann wie bei 2.10.2. beschrieben mit Jod oxidiert. Das freigesetzte Nitrit wurde wiederum mit α-Naphthylamin nachgewiesen.
In diesem Test sind Aerobactin und seine Vorstufen 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin und 2-N-Citryl-6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin positiv. Die Unterscheidung zwischen Aerobactin und den beiden Vorstufen erfolgte durch Kreuzfütterung, die anderen beiden Substanzen wurden von F. Engelbrecht durch ihr unterschiedliches Verhalten bei einer Ionenaustauschchromatographie, durch Vergleich des Laufverhaltens im Aminosäureanalysator mit einer synthetisch hergestellten Referenzsubstanz und durch enzymatischen Nachweis von Citrat nachgewiesen (27).

2.11. Isolierung von Plasmiden

2.11.1. Schnellmethode zum "Screening" von Plasmiden (7)

Die Zellen wurden in 10 ml TY-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum zur Selektion auf das Plasmid über Nacht in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane bei 37°C angezogen. 1 ml dieser Kultur wurde in einem Eppendorff-Reaktionsgefäß für 15 Sec. abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 100 µl einer Lösung von 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 100 µg Lysozym resuspendiert. Die Probe wurde dann für 30 Min. auf Eis gestellt. Nun wurden 200 µl einer Lösung von 0,2 N NaOH, 1% SDS zugegeben und kräftig durchmischt. Nach 5 Min. Inkubation auf Eis wurden 150 µl einer Lösung von 3 M K-Acetat, 1,8 M Formiat

zugegeben und vorsichtig durchmischt. Nach weiteren 30 Min. Inkubation auf Eis wurde für 2 Min. abzentrifugiert und 350 µl des Überstandes mit 1 ml eiskaltem Äthanol für 15 Min. bei -20 C gefällt. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Sediment in 100 µl einer Lösung von 0,1 M Na-Acetat, 50 mM MOPS, pH 8,0 resuspendiert und nochmals mit 200 µl eiskaltem Äthanol gefällt. Das Sediment wurde nach 15 Min. Fällung in einem Exsikkator getrocknet und danach in 40 µl bidest. Wasser aufgenommen. Die DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.11.2. Präparative Schnellmethode (7)

Die Zellen wurden in 500 ml TY-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit einer Schikane bis zu einer OD_{578} von 1,0 angezogen. Dann wurden zur Amplifikation der Plasmide bei Stämmen mit pBR322 Derivaten 170 µg/ml Chloramphenicol und bei Stämmen mit pACYC184 Derivaten 200 µg/ml Spectinomycin zugegeben und die Kultur für 15 Std. unter guter Belüftung weiterinkubiert.
Danach wurden die Zellen bei 4°C für 15 Min. mit 6000 x g geerntet und in 50 ml deion. Wasser aufgenommen. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Bakterien in 1 ml einer Lösung von 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert und auf Eis gestellt. Nun wurden 9 ml derselben Lösung, zu der noch 1 mg/ml Lysozym eingewogen worden war, zugegeben und gut durchmischt. Nach 30 Min. Inkubation auf Eis wurden 20 ml einer Lösung von 0,2 N NaOH, 1% SDS zugegeben und mit einem Glasstab umgerührt, bis die Lösung homogen war. Nach weiteren 10 Min. auf Eis wurden 15 ml einer Lösung von 3 M K-Acetat, 1,8 M Formiat zugegeben und für weitere 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 10 Min. bei 4°C mit

12000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit doppeltem Volumen eiskaltem Äthanol versetzt und für 20 Min. bei -20 C inkubiert. Die DNA wurde dann für 10 Min. bei 4°C mit 12000 x g abzentrifugiert und in 5 ml einer Lösung von 0,1 M Na-Acetat, 50 mM MOPS, pH 8,0 aufgenommen. Die Äthanolfällung wurde nochmals wiederholt. Nach dem Abzentrifugieren wurde die DNA in 2 ml deion. Wasser gelöst und gleiches Volumen einer Lösung von 5 M LiCl, 50 mM MOPS, pH 8,0 zugegeben. Nach 15 Min. auf Eis wurde der Niederschlag für 10 Min. auf 60°C erhitzt und nochmals abzentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin erneut mit Äthanol gefällt. Das Sediment wurde nach der Fällung in 2,5 ml Acetat-MOPS-Lösung resuspendiert und nochmals mit Äthanol gefällt. Das Sediment wurde in 2 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen und 10 µg RNase, die zuvor für 10 Min. gekocht worden war, zugegeben. Der Ansatz wurde für 15 Min. bei 37°C inkubiert, bevor 10 µg Proteinase K zugesetzt und für weitere 30 Min. bei 37°C inkubiert wurden. Bei Raumtemperatur wurden dann 40 µl 10% SDS, 2 ml der Acetat-MOPS-Lösung und tropfenweise 4 ml Isopropanol zugegeben. Nach 15 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 15 Min. mit 12000 x g ebenfalls bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 2 ml der Acetat-MOPS-Lösung aufgenommen und wieder für 15 Min. mit Äthanol gefällt. Die DNA wurde nach der Fällung in 1 ml TE-Puffer resuspendiert und zwei Mal mit wassergesättigtem Phenol extrahiert. Das Phenol wurde anschließend zwei Mal mit Äther extrahiert. Die DNA-haltige Phase wurde nochmals mit Äthanol gefällt. Das Sediment wurde im Exsikkator getrocknet und in 1 ml TE-Puffer gelöst. Aufbewahrt wurde die DNA in kleinen Portionen in Eppendorff-Reaktionsgefäßen bei -20°C.

2.11.3. Isolierung von ColV Plasmiden durch Dichtegradientenzentrifugation (20,52)

Die Bakterien wurden in 2 l TY-Medium in zwei 2 l Erlenmeyerkolben mit einer Schikane bei 37°C bzw. bei 27°C angezogen. Die Zellen wurden bei einer OD_{578} von 1,5 bis 2,0 für 15 Min. bei 4°C mit 6000 x g geerntet. Das Zellsediment wurde in 400 ml 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0 resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Sediment in 85 ml einer eiskalten Lösung von 50 mM Tris-HCl, 25% Saccharose, pH 8,0 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf acht Kunststoffzentrifugenbecher des Sorvall Rotors SS34 verteilt und je 5 ml einer eiskalten Lösung von 5 mg/ml Lysozym, 50 µg/ml RNase zugegeben. Die RNase war zuvor für 10 Min. gekocht worden. Die Lösung wurde für 5 Min. auf Eis gestellt, bevor je 4,3 ml eiskalter 0,25 M EDTA-Lösung, pH 8,0 zugegeben wurden. Als nächstes gab man je 18 ml einer Detergentienlösung (10 g/l Brij 58, 23,5 g/l EDTA, 6,05 g/l Tris, 4 g/l Na-Desoxycholat, pH 8,0 mit NaOH eingestellt) zu und mischte gut durch. Nach 30 Min. Inkubation auf Eis wurde für 45 Min. bei 4°C mit 40000 x g abzentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt, und pro 100 ml Überstand wurden 2,9 g NaCl und 10 g PEG 6000 zugesetzt. Danach fällte man die DNA für 48 Std. bei 4°C. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Sediment in 10 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,3) aufgenommen und ein Mal mit wassergesättigtem Phenol extrahiert. Die wässrige Phase wurde über Nacht bei -20°C mit doppeltem Volumen Äthanol gefällt und bei 4°C mit 12000 x g für 30 Min. abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 12,8 ml TES-Lösung (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH7,5) aufgenommen. Die Lösung wurde mit 0,8 ml einer Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml)

und mit 13,9 g CsCl versetzt. Dann wurde der Ansatz in einen Zentrifugenbecher für den Beckmann Vertikalrotor VTi50 eingefüllt, der Becher mit flüssigem Paraffin aufgefüllt und für 20 Std. bei 20°C mit 40000 x g im Rotor VTi50 in einer Beckmann Ultrazentrifuge Modell L5-65 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Röhrchen seitlich mit UV-Licht durchleuchtet. Von den zwei sichtbaren Banden wurde die untere, die die "supercoiled" Plasmid DNA enthielt, mit einer Spritze abgezogen. Das Ethidiumbromid wurde dann mit Isopropanol, das mit CsCl und TE-Puffer gesättigt war, extrahiert, bis die plasmidhaltige Phase keine Rotfärbung mehr aufwies. Die Plasmidlösung wurde dann für 48 Std. bei 4°C gegen 4 1 TE-Puffer dialysiert. Die DNA wurde in verschraubbaren Reagensgläsern mit einem Tropfen Chloroform bei 4°C aufbewahrt.

2.12. Isolierung von λCI_{857}Sam7 DNA (51)

Der λ-lysogene Stamm wurde in 2 1 TY-Medium, das noch mit 1 mM $MgSO_4$ angereichert worden war, in zwei 2 1 Erlenmeyerkolben mit einer Schikane bei 27°C bis zu einer OD_{578} von 0,4 angezogen. Dann wurden die Prophagen durch Erhöhung der Temperatur für 30 Min. auf 43°C induziert. Zur weiteren Phagenvermehrung wurden die Zellen für 3 Std. unter guter Belüftung bei 37°C inkubiert und danach mit 6000 x g bei 4°C für 15 Min. geerntet. Das Sediment wurde in 20 ml Phagenpuffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 7,5) aufgenommen und einige Tropfen Chloroform zugegeben. Zur Lyse der Bakterien wurde für weitere 20 Min. bei 37°C inkubiert. Als nächstes gab man je 50 µg/ml DNase und RNase zu und inkubierte den Ansatz für 20 Min. bei 37 C. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 4°C

für 15 Min. bei 6000 x g abzentrifugiert. Jeweils 5 ml des phagenhaltigen Überstandes wurden einem CsCl Stufengradienten folgender Zusammensetzung aufgelagert: 1,7 g/cm³, 1,6 g/cm³, 1,52 g/cm³, 1,45 g/cm³, 1,4 g/cm³ und 1,25 g/cm³ (angegeben sind die Dichten der CsCl Lösungen). Die vier Proben wurden über Nacht im Beckmann Rotor SW40Ti in der Beckmann Ultrazentrifuge L5-65 bei 20°C mit 70000 x g zentrifugiert. Am nächsten Tag wurden die Phagenbanden mit einer Pasteurpipette abgesaugt und 48 Std. gegen Phagenpuffer dialysiert. Nach der Dialyse wurde zwei Mal mit gleichem Volumen an wassergesättigtem Phenol extrahiert. Der DNA haltige Überstand wurde mit doppeltem Volumen an eiskaltem Äthanol versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Die DNA wurde dann bei 4°C für 30 Min. mit 12000 x g abzentrifugiert und in 1 ml TE-Puffer aufgenommen. Zuletzt wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym HindIII gespalten (2.14.), um bei Agarosegelelektrophoresen als DNA Längenstandard benutzt werden zu können (2.22.). Die gespaltene DNA wurde mit Auftragspuffer (2.14.) versetzt und in kleinen Portionen bei -20°C aufbewahrt.

2.13. Bestimmung von DNA Konzentrationen

Die DNA Konzentration hochgereinigter Proben wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm nach folgender Formel abgeschätzt:

$$\frac{OD_{260}}{0,02} = \mu g \text{ DNA/ml}$$

2.14. Bedingungen für die DNA Spaltung mit Restriktionsenzymen (66)

Die Restriktionsenzyme wurden ihren jeweiligen Salzansprüchen entsprechend in vier verschiedenen Puffern mit der zu spaltenden DNA inkubiert:

a) niedriges Salzbedürfnis:
   10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7,5
   Enzyme: BglII, ClaI
b) 10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, pH 7,5
   Enzyme: AvaI, BamHI, BglI, EcoRV, HindIII, PstI
c) 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, pH 7,5
   Enzyme: EcoRI, PvuI, SalI, XhoI
d) besonderer Puffer für das Enzym SmaI:
   10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 20 mM KCl, pH 8,0

In der Regel wurde 1 µg DNA mit 1-5 Einheiten Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 µl für 1 bis 2 Std. bei 37°C inkubiert. Die Spaltung mit SmaI erfolgte bei 30°C. Wenn erforderlich wurden die Enzymlösungen den Angaben des Herstellers entsprechend verdünnt.
Partielle Spaltungen wurden durch Ansätze mit verschiedenen Verdünnungen der Restriktionsenzymlösung erzielt. Das Resultat der verschiedenen Ansätze wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft.
Die Enzymreaktionen wurden durch Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65°C für 10 Min. gestoppt, bzw. bei anschließender Gelelektrophorese durch Zugabe von 5 µl Auftragspuffer (4 M Harnstoff, 50% Saccharose, 50 mM EDTA, 0,1% Bromphenolblau, pH 7,0).
Bei Doppelspaltungen mit zwei Restriktionsenzymen wurden die Enzyme dem Ansatz gleichzeitig zugesetzt, wenn die Salzansprüche der Enzyme gleich waren. Benötigte ein Enzym eine höhere Salzkonzentration als das andere, wurde

zunächst mit dem Enzym mit den niedrigeren Salzansprüchen inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung wurde dann der Salzgehalt auf die Bedürfnisse des zweiten Enzyms eingestellt und das zweite Enzym zugegeben.

2.15. Bedingungen für die Nuklease Bal31 (63)

Die Nuklease Bal31 wurde mit folgendem Inkubationspuffer eingesetzt:
20 mM Tris-HCl, 600 mM NaCl, 12,5 mM $MgCl_2$, 12,5 mM $CaCl_2$, 1 mM EDTA, pH 7,2
Zunächst wurde in einem Vorversuch eine Kinetik der Bal31 Aktivität für das jeweilige DNA Substrat erstellt. Hierzu wurde die DNA in einem Gesamtvolumen von 40 µl mit 1 Einheit Bal31 bei Raumtemperatur inkubiert und nach 0, 5, 15 und 30 Min. je 10 µl entnommen und die Reaktion durch Abkühlen auf 0°C und durch Zugabe von EGTA zu einer Endkonzentration von 20 mM gestoppt. Durch Agarosegelelektrophorese der vier Proben wurde dann die Aktivität der Nuklease in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ungefähr ermittelt. Im Hauptversuch wurde dann die im Vorversuch ermittelte Inkubationszeit zur Abspaltung der gewünschten Anzahl an Nukleotiden eingesetzt.

2.16. Bedingungen für die Ligation von DNA (66)

Die DNA Konzentrationen betrugen bei Ligationsansätzen zwischen 80 und 200 µg/ml. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 30 µl in folgendem Puffer:
50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 5 mM DTE, 50 µg/ml Rinderserumalbumin, pH 7,5
Bei der Ligation von Restriktionsfragmenten mit überlappenden Enden wurde dem Ansatz eine Einheit T4-DNA-Ligase zugesetzt und für 4 Std. bei 15°C inkubiert. Dann wurde

der Ligationsansatz über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde zur Kontrolle der Ligation mit einem Teil des Ansatzes eine Agarosegelelektrophorese (2.21.) durchgeführt, der andere Teil stand der Transformation zur Verfügung (2.17.).
Bei der Ligation von DNA mit glatten Enden und nach Einwirken der Nuklease Bal31 wurde eine hochkonzentrierte T4-DNA-Ligaselösung eingesetzt und einem Ligationsansatz etwa 100 Einheiten Ligase zugesetzt. Hierbei wurde die gesamte Ligation bei 4°C durchgeführt.

2.17. Transformation mit Plasmid DNA (25)

Zur Transformation von "supercoiled" oder linearisierter Plasmid DNA wurde der jeweilige Rezipient aus einer Übernachtkultur in 50 ml TY-Medium zu einer OD_{578} von 0,05 angeimpft und unter guter Belüftung in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 0,2 angezogen. Nach dem Erreichen dieser Zelldichte wurden die Zellen für 10 Min. auf Eis gestellt und danach für 10 Min. bei 4°C mit 6000 x g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 20 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ Lösung resuspendiert und für 20 Min. auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und in 0,5 ml der eiskalten $CaCl_2$ Lösung aufgenommen. 100 µl dieser Zellsuspension wurden mit maximal 1 µg Plasmid DNA vermischt und für 10 Min. auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann für 5 Min. auf 37°C erhitzt. Anschließend gab man 2 ml TY-Medium zu und inkubierte die Zellen unter kräftigen Schütteln für 1 Std. bei 37°C. Zuletzt wurden verschiedene Verdünnungen des Ansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht

bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Transformanten auf den Selektionsplatten auf Einzelkolonien ausgestrichen, die dann auf ihre Eigenschaften hin kontrolliert bzw. untersucht wurden.

2.18. Konjugation

Der Donor und der Rezipient wurden über Nacht angezogen. Je 0,5 ml wurden abzentrifugiert. Der Donor wurde wieder in 0,5 ml, der Rezipient in 0,1 ml TY-Medium aufgenommen. Dann wurden jeweils 0,1 ml des Donors und des Rezipienten auf ein Membranfilter gegeben, das auf eine TY-Platte gelegt worden war. Die Platte mit dem Filter wurde dann für 6 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Filter mit 3 ml TY-Medium gewaschen. Von verschiedenen Verdünnungen dieser Zellsuspension wurden je 100 µl auf Selektionsplatten ausplattiert, die sowohl das Wachstum des Donors als auch des Rezipienten verhinderten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Konjuganten auf den Selektionsplatten auf Einzelkolonien ausgestrichen und auf ihre Eigenschaften hin kontrolliert bzw. untersucht.

2.19. Mutagenese mit Tn1000 (41)

Der Stamm CR63 wurde mit dem zu mutagenisierenden Multicopy-Plasmid transformiert (2.17.). Tn1000 vermittelte Kointegrate zwischen dem F-Faktor von CR63 und dem Multicopy-Plasmid wurden durch Konjugation (2.18.) in den Stamm EN75 transferiert. Bei der Konjugation wurde auf die Spectinomycin Resistenz von EN75 und auf die Resistenz des Multicopy-Plasmids selektioniert. Die Plasmide der

Konjuganten wurden durch die Schnellmethode (2.11.1.) isoliert und durch Agarosegelelektrophorese (2.21.) auf die Insertion von Tn1000 hin untersucht.

2.20. Mutagenese mit Mud1(Ap,lac) (18)

2.20.1. Herstellung des Mud1-Lysats

5 ml TY-Medium wurden mit einer Übernachtkultur des Stammes MAL103 auf eine OD_{578} von 0,05 angeimpft und bei 27°C in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane unter guter Belüftung bis zu einer OD_{578} von 0,1 angezogen. Zur Induktion der Prophagen wurde dann die Temperatur auf 43°C für 20 Min. erhöht. Danach wurde für weitere 50 Min. bei 37°C weiterinkubiert bis zur Zellyse, die photometrisch verfolgt wurde. Nun wurden einige Tropfen Chloroform zugegeben und für weitere 5 Min. bei 37°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden bei 4°C für 10 Min. mit 6000 x g abzentrifugiert. Der phagenhaltige Überstand wurde mit einem Tropfen Chloroform in einem verschraubbaren Reagensglas bei 4°C aufbewahrt, doch sollten Mu-Lysate wegen ihrer großen Instabilität schnell benutzt werden.

2.20.2. Mutagenese mit Mud1

Der zu mutagenisierende Stamm (lac) wurde aus einer Übernachtkultur in 10 ml TY-Medium auf eine OD_{578} von 0,05 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 1,0 angezogen. Dann wurden dem Medium 10 mM $MgSO_4$ und 5 mM $CaCl_2$ zugesetzt. 0,1 ml der Zellsuspension wurden mit 0,1 ml des Mud1-Lysats (2.20.1.) für 20 Min. bei 27°C inkubiert. Danach wurden 0,2 ml einer 1 M Na-Citrat-

Lösung und 1 ml TY-Medium zugegeben. Der Ansatz wurde für 3 Std. bei 27°C unter guter Belüftung weiter inkubiert. Von der Zellsuspension wurden dann verschiedene Verdünnungen auf eisenarme MacConkey-Platten mit 25 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 27°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden rosarote bis rote Kolonien auf die Eisenregulierbarkeit ihrer ß-Galaktosidasefusionen hin untersucht, indem sie auf MacConkey-Platten mit 50 µM $FeCl_3$, auf die ein in 20 mM Dipyridyl getränkter Filterstreifen gelegt worden war, quer zu dem Filterstreifen ausgestrichen wurden. Eisenregulierte Operonfusionen zeigten im eisenverarmten Diffusionsbereich von Dipyridyl starke Rotfärbung.

2.21. Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophoresen wurden mit Flachbettelektrophoresegeräten des Modells H4 und des Modells H6 der Firma Bethesda Research Laboratories, Inc., Rockville, USA, durchgeführt. Die Agarosekonzentrationen wurden zwischen 0,5% und 1% variiert, je nachdem, ob nieder- oder hochmolekulare DNA aufgetrennt werden sollte. Als Elektrophoresepuffer wurde TEA-Puffer (25 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,9) benutzt. Die Elektrophoresen erfolgten mit 50 mA für 4 Std. bei Modell H4 und mit 25 mA für 1 Std. bei Modell H6.
Zur Anfärbung der DNA wurde in die noch flüssige Agarose vor dem Gießen des Gels 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gegeben. Vor dem Auftragen einer Probe in die Geltasche wurde sie mit einem Viertel Volumen Auftragspuffer (4 M Harnstoff, 50% Saccharose, 50 mM EDTA, 0,1% Bromphenolblau, pH 7,0) versetzt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA

mit einem UV Transilluminator der Firma Ultraviolet Products, San Gabriel, California, USA sichtbar gemacht und mit einer Polaroid MP-4 Land Camera bei einer Blende von 5,6 für 20 Sec. mit einem Polaroid Positiv-Negativ Film Typ 665 fotografiert.

2.22. Molekulargewichtsbestimmung von Restriktionsfragmenten

Um die Molekulargewichte von elektrophoretisch aufgetrennten DNA Fragmenten zu bestimmen, wurde für jedes Gel eine Eichkurve erstellt. Hierzu diente die HindIII geschnittene DNA des Phagen λ als Längenstandard (2.12.). λ DNA ergibt hierbei folgende Fragmente (in Kilobasen): 32,13 / 9,146 / 6,682 / 4,361 / 2,322 / 2,027 / 0,564 / 0,125 (83).
Werden die Laufstrecken dieser Fragmente auf der Abszisse arithmetisch und die Molekulargewichte der Fragmente auf der Ordinate logarithmisch aufgetragen, erhält man eine Eichkurve für die Bestimmung der Molekulargewichte unbekannter DNA Fragmente.

2.23. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die mit Ethidiumbromid angefärbte auf dem UV Transilluminator sichtbar gemachte DNA Bande wurde mit einer Rasierklinge möglichst genau aus dem Gel ausgeschnitten. Das Agarosestück wurde in ein Eppendorff-Gefäß gegeben und mit einem Spatel zerstoßen. Dann wurde gleiches Volumen an wassergesättigtem Phenol zugegeben und kräftig auf dem Vortex durchmischt. Die Probe wurde danach für mindestens 60 Min. bei -70°C tiefgefroren. Danach wurde sie in der Eppendorff-Zentrifuge für 10 Min.

zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde nochmals mit wassergesättigtem Phenol extrahiert. Dann wurde 1/10 Volumen einer Lösung von 2,5 M Na-Acetat zugegeben und mit doppeltem Volumen an eiskaltem Äthanol für 15 Min. bei -20°C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren wusch man das Sediment mit 1 ml 70% Äthanol und trocknete die Probe anschließend im Exsikkator. Die DNA wurde dann in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

2.24. Expression plasmidcodierter Proteine im Minizellsystem (69)

Die Abkömmlinge des Minizellproduzenten DS410 wurden über Nacht in 400 ml TY-Medium, dem 1 g/l Glukose zugesetzt worden war, angezogen. Zur Induktion eisenregulierter Gene wurde teilweise noch 50 µM Dipyridyl zugegeben. Die Zellen wurden bei 4°C für 15 Min. mit 6000 x g geerntet und in 10 ml eiskalten M9-Salzen resuspendiert. Je 5 ml dieser Zellsuspension wurden einem 30 ml umfassenden Saccharosegradienten (10%-30%) aufgelagert. Dieser Gradient wurde aus einer 20% Saccharoselösung erzeugt, indem die Saccharoselösung bei -20°C tiefgefroren und langsam über Nacht bei 4°C wieder aufgetaut wurde. Nachdem die Zellsuspension dem Gradienten aufgelagert worden war, zentrifugierte man den Ansatz im Sorvall HS-4 Rotor bei 4°C für 20 Min. mit 4000 Upm. Die Minizellbande war danach etwa in der Mitte des Gradienten sichtbar und konnte mit einer Pasteurpipette abgezogen werden. Der Minizellsuspension wurde gleiches Volumen an M9-Salzen zugegeben, und die Minizellen anschließend bei 4°C für 10 Min. mit 30000 x g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml M9-Salzen aufgenommen und die Gradientenzentrifugation zwei Mal in gleicher

Weise wiederholt. Nach dem dritten Saccharosegradienten wurden die Minizellen ebenfalls wieder mit einer Pasteurpipette geerntet, mit gleichem Volumen an M9-Salzen versetzt und abzentrifugiert. Sie wurden dann aber in 1 ml M9-Medium resuspendiert.
0,5 ml einer Minizellsuspension in M9-Medium mit einer OD_{578} von 1,0 wurden dann in Gegenwart von 4 mM Cycloserin für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Nach dieser Vorinkubation wurden entweder 4 µCi ^{14}C-Aminosäuregemisch oder 50 µCi ^{35}S-Methionin pro Ansatz zugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 Sec. in der Eppendorff-Zentrifuge abzentrifugiert und in 50 µl Auftragspuffer (2% SDS, 10% Glycerin, 5% 2-Mercaptoäthanol, 0,001% Bromphenolblau) aufgenommen und auf dem Vortex gut resuspendiert. Vor dem Auftragen auf die Polyacrylamidgelelektrophorese (2.25.) wurden die Proben für 5 Min. aufgekocht. Die Aufbewahrung der so markierten Proben erfolgte bei -20°C.

2.25. Polyacrylamidgelelektrophorese (65)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zur Auftrennung der im Minizellsystem markierten Proteine benutzt.
Es wurde eine Apparatur der Firma Hoefer Scientific Instruments verwendet. Die Gele waren 1,0 mm dick und 12 cm lang.
Es wurden 5 bis 10 µl der Minizellproben (2.24.) in die Taschen des Sammelgels eingefüllt.
Das Sammelgel bestand aus 3% Acrylamid, 0,08% Bisacrylamid, 0,1% SDS in 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8. Zur Polymerisation wurden 0,2% Ammoniumpersulfat und 0,02% TMED zugegeben.
Die eigentliche Auftrennung der Proteine erfolgte im Trenngel, das 11% bzw. 14% Acrylamid, 0,2% Bisacrylamid, 0,2% SDS in 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 enthielt. Auch hier wurde die Polymerisation durch Zugabe von 0,2% Ammoniumpersulfat und 0,02% TMED gestartet.

Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur mit einer Stromstärke von 14 mA durchgeführt. Der Elektrophoresepuffer enthielt 0,192 M Glycin, 0,1% SDS, 0,025 M Tris-HCl, pH 8,0. Die Proteine wurden nach erfolgter Elektrophorese mit Serva Blau G, das in 50% Methanol und 10% Essigsäure gelöst war, gefärbt. Nach einer Stunde Färbedauer wurden die Gele mit einer wässrigen 7,5% Essigsäure- und 5% Methanollösung über Nacht entfärbt.

2.26. Autoradiographie

Nach dem Entfärben wurden die Polyacrylamidgele mit den radioaktiv markierten Proteinen für 15 Min. in 150 ml Amplify geschwenkt und dann getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte dann mit einem Kodak Röntgenfilm Typ X-Omat bei -70°C.

2.27. Untersuchung von DNA-DNA-Homologien

2.27.1. Nick-Translation (81)

Zur radioaktiven Markierung von DNA für Hybridisierungsexperimente wurde folgender Ansatz durchgeführt:

1 µg	DNA
3 µl	dNTP-Mix (je 0,2 mM dCTP, dGTP, dTTP)
3 µl	10xPuffer (0,5 M Tris-HCl, 50 mM $MgCl_2$, pH 7,9)
6 Einheiten	DNA Polymerase I
50 µCi	^{35}S-dATP

mit bidest. Wasser auf 30 µl auffüllen

Der Ansatz wurde für 90 Min. bei 15°C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA und durch 10 Min. Erhitzen auf 65°C gestoppt.

Die markierte DNA wurde von den nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden mit einer 2 ml umfassenden Sephadex G50 Superfine Säule abgetrennt. Es wurde mit TE-Puffer eluiert und jeweils 200 µl umfassende Fraktionen aufgefangen. 5 µl jeder Fraktion wurden mit 2 ml Quickszint 402 versetzt und im Szintillationszähler gemessen. Die Fraktion mit dem ersten hohen Radioaktivitätsgipfel wurde für die nachfolgenden Hybridisierungsexperimente eingesetzt, nachdem sie durch Zugabe von 200 µl einer Lösung von 0,5 M NaOH, 150 mM NaCl denaturiert und durch Zugabe von 1/10 Volumen einer Lösung von 1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 für je 15 Min. bei Raumtemperatur wieder neutralisiert worden war.

2.27.2. Southern Blot (85,93)

Nach der Agarosegelelektrophorese der zu hybridisierenden DNA und nach dem Fotografieren des Gels wurde es zur Depurinisierung zwei Mal für je 15 Min. bei Raumtemperatur in je 250 ml 0,25 M HCl geschwenkt. Zur Denaturierung wurde das Gel dann zwei Mal in je 250 ml einer Lösung von 0,5 M NaOH, 1 M NaCl für je 15 Min. bei Raumtemperatur geschwenkt. Dann wurde das Gel für 30 Min. bei Raumtemperatur in einer Lösung von 0,5 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7,3 neutralisiert. Die DNA wurde danach auf Nitrocellulose BA85 von Schleicher & Schüll transferiert. Hierzu wurde die Nitrocellulose zunächst in einer Lösung von 2xSSC eingeweicht (20xSSC: 175,3 g/l NaCl, 88,2 g/l Na-Citrat, pH 7,0 mit KOH einstellen). In eine Wanne wurden 2 Lagen Whatman 3 MM Papier gelegt und mit 20xSSC getränkt. Darauf wurde das Gel gelegt, das dann von oben her so mit einer Kunststoffolie eingerahmt wurde, daß der 20xSSC Puffer von oben her nur durch das Gel hindurch aufgesaugt werden konnte.

Auf das Gel wurde dann die Nitrocellulose gelegt. Auf diese wiederum legte man zwei Lagen Whatman 3 MM Papier, auf die dann Lagen mit Kleenex bis zu einer Gesamtstärke von 5 cm folgten. Auf die Lagen mit Kleenex wurde schließlich eine Glasplatte gelegt, die mit einem Gewicht von 1 Kg beschwert wurde. Der DNA-Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde die Nitrocellulose für 12 Std. bei 80°C gebacken, um die DNA fest zu binden.

2.27.3. DNA-DNA-Hybridisierung (93)

Die DNA-DNA-Hybridisierungen wurden bei verschiedenen Formamid-Konzentrationen durchgeführt. Hierbei wurde zwischen 20% und 50% Formamid variiert. Im Folgenden sei ein typischer Hybridisierungsvorgang für 50% Formamid beschrieben:
Die Nitrocellulose wurde nach dem Festbacken der DNA in einen Plastiksack gelegt und mit 4 ml Prähybridisierungslösung pro 100 cm^2 Filterfläche zusammen eingeschweißt. Diese Prähybridisierungslösung enthielt 50%(v/v) Formamid, 5xSSC, 5xDenhardts Lösung (100x Denhardts Lösung: 2% Rinderserumalbumin, 2% Ficoll 400, 2% Polyvinylpyrrolidon), 1% Glycin und 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA. Das Formamid war zuvor mittels des Mischbettionenaustauschers MB9 deionisiert worden. Die Nitrocellulose wurde für 3 bis 4 Std. in dieser Lösung bei 42°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurde die Prähybridisierungslösung abgegossen und die gleiche Menge an Hybridisierungslösung zugegeben. Diese Lösung enthielt 50%(v/v) Formamid, 5xSSC, 1xDenhardts Lösung, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma DNA, 0,3% SDS und die ^{35}S-dATP markierte Hybridisierungsprobe (10^7cpm/µg DNA). Nach einer Hybridisierungs-

dauer von 15 Std. bei 42°C wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und die Nitrocellulose gewaschen. Zunächst wurden zwei Waschungen für je 15 Min. in je 250 ml 2xSSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur durchgeführt. Dann folgten die stringenten Waschungen mit jeweils 250 ml 0,1xSSC, 0,1% SDS bei 42°C für je 15 Min. Die Anzahl dieser Waschungen wurde variiert, bis keine unspezifischen Markierungen auf nicht homologer Kontroll-DNA nach der Autoradiographie sichtbar waren. Nach den Waschungen wurde die Nitrocellulose bei 37°C für 2 Std. getrocknet und zur Autoradiographie mit einem Kodak Röntgenfilm inkubiert (2.26.).

3. ERGEBNISSE

3.1. Genetische Charakterisierung von pColV-K311/11 und von Mutanten im Aerobactinsystem

3.1.1. Physiologische Eigenschaften der Mutanten

Es wurden fünf Mud1 Insertionsmutanten (K311/1107, ZI346, ZI347, ZI349 und ZI350), eine Tn*5* Insertionsmutante (WO916) und eine Deletionsmutante (TK12) im Aerobactinsystem untersucht. Das Wildtyp-Plasmid pColV-K311/11 und das mutierte Plasmid pColV-K311/1107 sind bereits in der Diplomarbeit (38) teilweise charakterisiert worden.

Bei allen Mud1 Insertionsmutanten im Aerobactinsystem war die Expression der ß-Galaktosidase, die ja mit dem Phagen Mud1(Ap,*lac*) in einem Schritt unter die Kontrolle fremder Regulationselemente gebracht werden kann (18), eisenregulierbar. Im Querstrichtest auf eisenreichen MacConkey-Platten gegen einen in 20 mM Dipyridyl getränkten Filterstreifen (2.20.2.) wurden die fünf Mutanten im Diffusionsbereich von Dipyridyl rot.

Der Test auf Aerobactinsynthese durch Kreuzfütterung (2.9.) verlief bei den Mutanten ZI346, ZI350,K311/1107, WO916 und TK12 negativ, die Mutanten ZI347 und ZI349 hingegen konnten den Indikatorstamm EN41 zum Wachstum stimulieren.

Im chemischen Nachweisverfahren von Hydroxamsäureverbindungen (2.10.) konnte bei den Stämmen ZI346, ZI350, K311/1107, WO916 und TK12 keine Hydroxamsäure nachgewiesen werden, die Stämme ZI347 und ZI349 zeigten auch hier eine positive Reaktion (27).

Im Test auf Sensitivität gegen Cloacin DF13, das ja den plasmidcodierten Ferri-Aerobactinrezeptor Iut ebenfalls

als Rezeptor braucht (2.8.), zeigten sich die Stämme ZI346, ZI349, ZI350, K311/1107 und WO916 sensitiv. Die Sensitivität war aber bei allen Stämmen mit Ausnahme von ZI349 deutlich geringer als beim Kontrollstamm EN775. Bei EN775 konnte die Bacteriocinlösung mindestens einen Zehnerschritt weiter verdünnt werden, als bei den Mutanten, um noch einen klaren Hemmhof zu erhalten. Die Stämme ZI347 und TK12 waren resistent gegen Cloacin DF13.

Auf eisenarmen NB-Platten mit 200 µM Dipyridyl konnte von den Mutanten nur der Stamm ZI349 wachsen, wenn auch deutlich schlechter als der Kontrollstamm EN775. Diese Daten sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tab. 1: Physiologische Eigenschaften der untersuchten Mutanten

Stamm	Kreuzfütterung von EN41	Chemischer Test(2.10.3)	Sensitivit. geg. Cloacin	Wachstum auf NBD
K311/11	+	+	+	+
EN775	+	+	+	+
K311/1107	-	-	(+)	-
ZI346	-	-	(+)	-
ZI347	+	+	-	-
ZI349	+	+	+	(+)
ZI350	-	-	(+)	-
WO916	-	-	(+)	-
TK12	-	-	-	-

+ positiv
(+) schwach positiv
- negativ

Diese Ergebnisse zeigten, daß die Insertionen von Mud1 bzw. Tn5 bei den Stämmen ZI346, ZI350, K311/1107 und WO916 in die Syntheseregion von Aerobactin erfolgt sind. Die Mud1 Insertion bei ZI347 muß ins Rezeptorgen erfolgt sein. Die Deletion bei TK12 umfaßt möglicherweise den gesamten Aerobactinbereich, da alle Funktionen ausgefallen sind.

In welcher Beziehung die Mud1 Insertion des Stammes ZI349 zum Aerobactinsystem steht, ist unklar. Lediglich das schlechtere Wachstum des Stammes unter Eisenmangelbedingungen und die Eisenregulierbarkeit der ß-Galaktosidaseexpression weisen auf eine Mutation im Aerobactinsystem hin. Die Insertion wäre dann aber in einem nicht essentiellen Bereich erfolgt.

3.1.2. Restriktionsanalyse der Insertions- und Deletionsplasmide

Die Plasmide pColV-K311/11 und pColV-K311/1107 waren bereits in der Diplomarbeit einer teilweisen Analyse unterzogen worden (38). Durch die Spaltung mit Restriktionsenzymen konnte für pColV-K311/11 eine ungefähre Größe von 123 Kb und für pColV-K311/1107 eine Größe von 160 Kb ermittelt werden. Die Restriktionskarten von Mud1, Tn*5*, Tn*10* und Tn*1000* sind bekannt (2.4.) und wurden für die hier vorgenommene Restriktionsanalyse benutzt.

Die Plasmide pColV-K311/1107 und pColV-TK12 sind direkt von pColV-K311/11 abgeleitet. Die Plasmide pColV-ZI346, pColV-ZI347, pColV-ZI349, pColV-ZI350 und pColV-WO916 sind vom Plasmid pColV-EN775 abgeleitet, das wiederum aus pColV-K311/11 durch eine Tn*10* Insertion in einem das Aerobactinsystem nicht betreffenden Bereich des Plasmides entstanden ist (Abb. 10).
Die Identifizierung der Restriktionsfragmente, die durch die Mutationen verändert worden waren und deshalb in Zusammenhang mit dem Aerobactinsystem gebracht werden müssen, erfolgte durch den Vergleich des Restriktionsmusters dieser Plasmide mit dem Restriktionsmuster des Wildtypplasmids pColV-K311/11 nach Einfach- und Doppelspaltungen mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Cla*I, *Eco*RI,

HindIII und SalI.

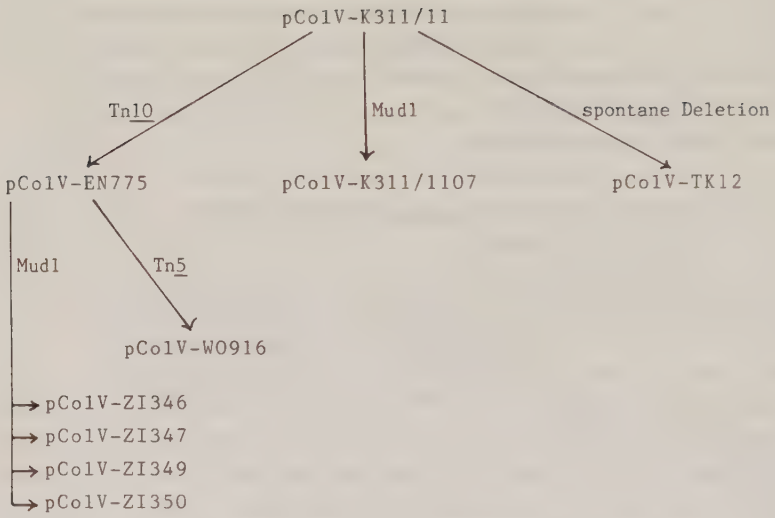


Abb. 10: Konstruktionsschema der für die Restriktionsanalyse benutzten Plasmide

Die Tab. 2 zeigt die Zusammenstellung der Fragmentgrößen der Plasmide nach Spaltung mit BamHI.
Betrachten wir als Beispiel für die Restriktionsanalyse das Plasmid pCo1V-ZI349 im Vergleich zum Plasmid pCo1V-EN775:
Außer den von der Mud1 DNA stammenden Fragmenten J (9,8 Kb) und R (3,8 Kb) sieht man bei pCo1V-ZI349 noch zwei weitere neue Fragmente im Vergleich mit pCo1V-EN775, ein 52 Kb großes Fragment B und ein 9,6 Kb großes Fragment K. Bei pCo1V-ZI349 ist das eine der beiden 38 Kb großen Fragmente D von pCo1V-EN775 verschwunden. Das bedeutet, daß Mud1 in dieses 38 Kb Fragment von pCo1V-EN775 inseriert ist, wobei nach Spaltung mit BamHI zwei neue Fragmente entstanden sind, die aus dem ursprüng-

Tab. 2: Fragmentgrößen von ColV Plasmiden nach Spaltung mit BamHI

Bande	Fragmentgroße nach BamHI Spaltung (Kb)								
	WO916	ZI347	ZI349	ZI350	ZI346	K311/1107	TK12	EN775	K311/11
A				53[cg]					
B			52[cg]						
C		48[cg]							
D	38[h]	38[e]	38[e]	38[e]	38[h]	38[h]	38[h]	38[h]	38[h]
E						27	27	-[e]	27
F	24[a]	24[a]	24[a]	24[a]	24[a]			24[a]	
G					16,9[c]	16,9[c]			
H					15,9[c]	15,9[c]			
I	14[a]	14[ach]	14[a]	14[a]	14[a]			14[a]	
J	9,8[d]	9,8[d]	9,8[d]	9,8[d]	9,8[d]	9,8[d]			
K			9,6[c]						
L	9,5[b]								
M	-[e]	9,1	9,1	9,1	-[e]	-[e]	-[f]	9,1	9,1
N				9,0[c]					
O	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9
P	5,5[b]								
Q	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
R		3,8[d]	3,8[d]	3,8[d]	3,8[d]	3,8[d]			
S	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
T	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
U	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
V	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
W	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-[f]	0,4	0,4
Summe	148,6				180,0	169,0	122,2	142,7	131,7

a durch Tn10 Insertion entstanden
b durch Tn5 Insertion entstanden
c durch Mudl Insertion entstanden
d Fragment von Mudl
e Insertionsfragment
f deletiert
g errechnete Fragmentgröße
h Doppelbande

lichen Fragment D von pColV-EN775 und aus den BamHI Endstücken der Mudl DNA bestehen. Diese Mudl Endstücke sind 15,5 Kb und 8,4 Kb groß (2.4.). Das bedeutet, daß in dem 9,6 Kb großen Fragment K von pColV-ZI349 nur das 8,4 Kb große Mudl Endstück enthalten sein kann. Die

Differenz der Größen des Fragmentes K und des Mud1 Endstücks ergibt direkt den Abstand der Insertionsstelle von einer der BamHI Schnittstellen des 38 Kb großen BamHI Fragmentes von pCo1V-EN775. Mud1 ist also 1,2 Kb von einer BamHI Schnittstelle entfernt in das Plasmid inseriert. Durch die ungleiche Größe der Mud1 Endstücke nach BamHI Spaltung kann auch die Orientierung des Phagen an der Insertionsstelle eindeutig festgelegt werden. Mud1 ist so in das 38 Kb große BamHI Fragment von pCo1V-EN775 im Abstand von 1,2 Kb von einem der Enden des Fragmentes inseriert, daß der Teil von Mud1 mit dem ß-Galaktosidasegen der nahen BamHI Schnittstelle zugewandt ist. Das ß-Galaktosidasegen von Mud1 ist in dem 8,4 Kb großen BamHI Endstück der Phagen DNA lokalisiert. Aus der Orientierung des Phagen läßt sich direkt die Transkriptionsrichtung an der Insertionsstelle ableiten. Da das ß-Galaktosidasegen nur durch einen externen Promotor angeschaltet werden kann, muß von außen in das 8,4 Kb große Mud1 BamHI Fragment hineingelesen werden. In unserem Falle ist der Phage so orientiert, daß aus der Richtung der 1,2 Kb entfernten BamHI Schnittstelle von pCo1V-EN775 in den Phagen hineingelesen werden muß. Die Transkriptionsrichtung am Insertionsort von Mud1 bei pCo1V-ZI349 verläuft damit in das 38 Kb große BamHI Fragment hinein.

In ähnlicher Weise wurden alle Plasmide durch Einfach- und Doppelspaltungen mit mehreren Restriktionsenzymen auf verschiedenen Gelsystemen analysiert. Das Ergebnis dieser Analyse ist die in Abb. 11 dargestellt physikalische Karte der Aerobactin Genregion von pCo1V-K311/11. Eigezeichnet sind außerdem die Insertionsstellen der Mud1 Phagen (b,c,d,e,f), von Tn5 (a) und die

Position der Deletion (g). Die Transkriptionsrichtung an den jeweiligen Mud1 Insertionsorten ist durch die gestrichelten Pfeile dargestellt.

Diese Analyse zeigte, daß alle den Aerobactinbereich betreffenden Mutationen in einem gut 7 Kb großen Bereich von pCoIV-K311/11 lokalisiert sind, daß die Transkriptionsrichtung an allen Mud1-Insertionsstellen gleich ist, und daß die Transkriptionsrichtung von der Syntheseregion, gekennzeichnet durch die Insertionen a, b, c und d, hin zum Gen des Rezeptors Iut, gekennzeichnet durch die Insertion f, verläuft.
Die Deletion bei pCoIV-TK12 erstreckt sich über den gesamten Bereich des Aerobactinsystems.
Die Mud1 Insertion von pCoIV-ZI349 ist tatsächlich im Aerobactinbereich erfolgt. Sie trennt möglicherweise den Synthese- vom Transportbereich.

Da die Transkriptionsrichtung an allen Mud1 Insertionsstellen gleich ist, und da Mutationen im Synthesebereich einen polaren Effekt auf die Expression des Rezeptorgens iut haben, liegt vermutlich ein Operon vor.

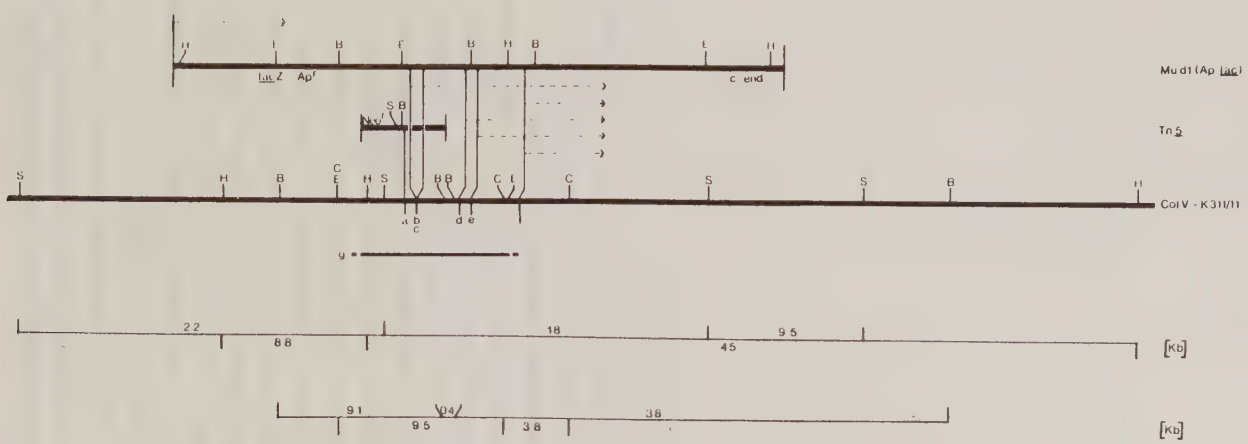


Abb. 11: Physikalische Karte der Aerobactinregion auf pColV-K311/11. Die physikalischen Karten von Tn5 und Mudl sind ebenfalls eingezeichnet. Die gestrichelten Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an den Mudl Insertionsstellen an. a kennzeichnet die Tn5 Insertion bei WO916, b-f die Mudl Insertionen bei K311/1107, ZI346, ZI350, ZI349 und ZI347, g die Deletion bei TK12. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind B,BamHI; E,EcoRI; H,HindIII; S,SalI; C,ClaI

3.2. Klonierung der Aerobactinregion von pColV-K311/11

3.2.1. Klonierung der Aerobactin Synthese- und Transportregion

Die Restriktionsanalyse von pColV-K311/11 (3.1.2.) ergab, daß vermutlich der gesamte Aerobactinbereich auf einem etwa 45 Kb großen HindIII Fragment enthalten ist. Um diesen Bereich zu klonieren, wurde pColV-EN775 mit HindIII vollständig gespalten. Nach Ligation mit dem ebenfalls mit HindIII geschnittenen Vektor pBR322 (2.4.) wurde der Stamm HB101 transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf TY-Platten mit 25 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Durch Querstreichen der Transformanten gegen Cloacin DF13 wurde eine sensitive Transformante unter 1000 untersuchten Kolonien gefunden. Dieser Klon wurde GR1 genannt. Er enthielt ein Plasmid, das als pRG1 bezeichnet wurde. Die Restriktionsanalyse zeigte, daß tatsächlich das 45 Kb große HindIII Fragment kloniert worden war. Zusätzlich enthielt pRG1 das dem 45 Kb Fragment benachbarte 8,8 Kb große HindIII Fragment, allerdings nicht in der ursprünglichen Orientierung (Abb. 12).
Das Plasmid pRG1 wurde in den aroB Stamm H1129, der wegen dieser Mutation kein Enterochelin mehr synthetisieren kann, transformiert zum Test auf die Synthese von Aerobactin. Der resultierende Stamm GR24 produzierte Aerobactin, wie durch den Kreuzfütterungstest (2.9.) gezeigt wurde. Auch im chemischen Test (2.10.3.) war der Stamm positiv (Tab. 3). Da der Stamm auf eisenarmen NBD-Platten wachsen konnte, mußte der gesamte Aerobactinbereich auf pRG1 codiert sein.
GR24 produzierte kein Colicin V. Wie die Klonierung der Colicin V Gene (nicht dargestellt) zeigte, sind sie auf einem etwa 20 Kb großen HindIII Fragment lokalisiert. Das bedeutet, daß die Colicin V Genregion nicht in

unmittelbarer Nähe des Aerobactinsystems ist.

3.2.2. Subklonierung der Aerobactin Syntheseregion

Die Restriktionsanalyse der Insertionsmutanten im Synthesebereich von pColV-K311/11 ergab, daß die Syntheseregion wahrscheinlich auf einem etwa 7 Kb großen HindIII/EcoRI Fragment enthalten ist. Um diese Region zu klonieren, wurde das Plasmid pRG1 mit EcoRI und HindIII gespalten (Abb. 12) und nach der Ligation in den synthesedefekten Stamm WO916 transformiert unter Selektion auf Ampicillin. Transformanten wurden auf NB-Platten mit 200 µM Dipyridyl ausplattiert. Alle Zellen, die unter diesen eisenarmen Bedingungen wachsen konnten, und damit den Defekt von WO916 durch Komplementation umgehen konnten, enthielten außer pColV-WO916 noch ein weiteres Plasmid, das pRG12 genannt wurde (Abb. 12). Einer dieser Stämme wurde stellvertretend ausgewählt und GR19 genannt.
Das Plasmid pRG12 wurde in den aroB Stamm H1443 transformiert. Mit dem resultierenden Stamm GR21 wurde durch Kreuzfütterung (2.9.) und durch den chemischen Test (2.10.) gezeigt, daß pRG12 tatsächlich für die gesamte zur Synthese von Aerobactin nötige Information codiert.
Außerdem wurde durch Variieren der Wachstumsbedingungen gezeigt, daß die Synthese von Aerobactin bei pRG12 immer noch vom Eisengehalt des Mediums abhängt. Unter eisenreichen Bedingungen wurde zwar bereits Aerobactin synthetisiert, doch ließ sich die Synthese unter Eisenmangelbedingungen etwa um das Doppelte steigern (Tab. 3). Das bedeutet, daß auf der klonierten Sequenz auch die Kontrollregion des Aerobactinsystems noch erhalten ist.

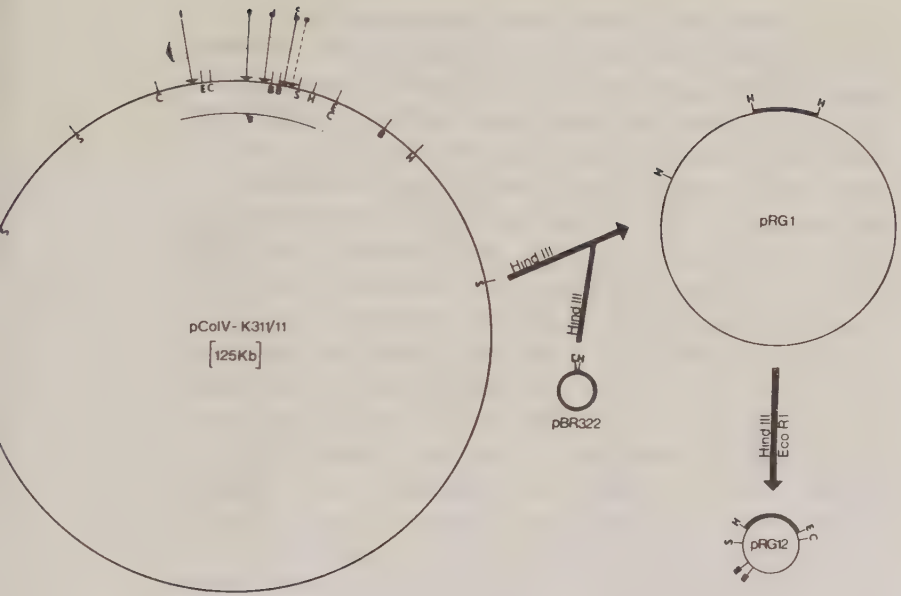


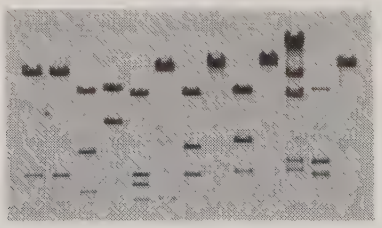
Abb. 12: Klonierung der gesamten Aerobactinregion und Subklonierung der Syntheseregion. Die Karte von pColV-K311/11 entspricht der Karte von Abb. 11, nur ist sie hier zirkulär. Alle Bezeichnungen sind die gleichen wie in Abb. 11.

Tab. 3: Abhängigkeit der Aerobactinproduktion bei Stämmen mit der klonierten Aerobactinregion vom Eisengehalt des Mediums

Stamm	Medium	OD_{578}	Stimulier. von EN41	Chemischer Test OD_{520}	Nitrit OD_{520}*
GR19	NB	1,05	++	0,6	0
	NBD	0,85	++	1,55	0.62
GR21	NB	1,0	++	1,5	0
	NBD	0,62	++	1,5	0,05
GR24	NB	0,41	++	1,3	0,45
	NBD	0,24	++	1,3	0,69

* Nitritgehalt des Mediums ≙ Nullwert des chemischen Tests auf Hydroxamsäuren

Das Plasmid pRG12 wurde einer Restriktionsanalyse durch Einfach- und Doppelspaltungen mit den Enzymen AvaI, BamHI, BglI, BglII, ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI, PvuI, SalI und SmaI unterworfen. Die Abb. 13 zeigt als Beispiel das Restiktionsmuster von pRG12 nach Spaltung mit einigen der Restriktionsenzyme. In der Abb. 14 ist die so ermittelte physikalische Karte von pRG12 dargestellt. Die Transkriptionsrichtung ist als gestrichelter Pfeil eingezeichnet. Das in pRB322 klonierte Fragment mit der vollständigen Syntheseregion ist 7 Kb groß. Auch der Aerobactin Kontrollbereich ist auf dem Plasmid noch vorhanden. Daß auch unter eisenreichen Bedingungen bereits Aerobactin synthetisiert wird, kann durch einen Gen-Dosis-Effekt wegen der hohen Kopienzahl von pBR322 erklärt werden. Klone mit pRG12 sind resistent gegen Cloacin DF13, da das iut Gen nicht oder nur unvollständig auf pRG12 enthalten ist. Die Analyse der MudI Insertion bei pCoIV-ZI347 zeigte ja bereits (3.1.2.), daß diese Insertion im Rezeptorgen rechts von der in pRG12 eingezeichneten EcoRI Schnittstelle liegt. Das Rezeptorgen kann also nicht vollständig auf pRG12 enthalten sein.



a b c d e f g h i j λ 1 m

Abb. 13: Restriktionsmuster von pRG12 nach Spaltung mit SmaI(a/b), SmaI/BamHI(c), BamHI(d), SmaI/SalI(e), SalI(f), SmaI/ClaI(g), ClaI(h), SmaI/EcoRI(i), EcoRI(j), SmaI/HindIII(1), HindIII(m). Längenstandard λDNA HindIII. Fragmente kleiner als 1,0 Kb sind nicht sichtbar.

Abb. 14: Physikalische Karte von pRG12. Die Transkriptionsrichtung ist als gestrichelter Pfeil dargestellt. Die DNA des Vektors pBR322 ist durch eine dick gezogene Linie gekennzeichnet.

3.2.3. Mutagenisierung des Syntheseklons pRG12

Aerobactin besteht aus zwei Molekülen 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin, die mit ihrer 2-Aminofunktion peptidisch mit einem Molekül Citrat verknüpft sind (Abb. 2). Für die Synthese dieses Moleküls ist ein Weg denkbar, bei dem Lysin zunächst durch N-Hydroxylierung und durch N-Acetylierung zur Hydroxamsäure umgesetzt wird; zwei dieser Lysinderivate könnten dann in einem dritten Schritt mit einem Molekül Citrat unter Bildung von Aerobactin verknüpft werden.

Durch die Mutagenisierung des Syntheseklons pRG12 sollten Derivate erzeugt werden, die in der Biosynthese von Aerobactin defekt sind und deshalb Vorstufen von Aerobactin anreichern. Diese Vorstufen sollten durch die chemischen Tests (2.10.) auf Hydroxylamin- und Hydroxamatfunktionen gefunden und dann charakterisiert werden. Diese chemische Charakterisierung der in den chemischen Tests positiven Substanzen wurde von F. Engelbrecht (27) durchgeführt. Durch diese Analyse sollte der Biosyntheseweg des Aerobactins aufgeklärt werden. Außerdem sollten die Mutationen kartiert werden, um auf diese Weise die an der Synthese beteiligten Gene zu lokalisieren. Diesen Genen sollten dann durch die Expression plasmidcodierter Proteine in *E. coli* Minizellen die jeweiligen Genprodukte zugeordnet werden.

3.2.3.1. Mutagenese mit Tn1000

Die Mutagenese mit Tn1000 beruht auf der Fähigkeit des auf dem F-Faktor vorkommenden Transposons, mit zusätzlich in der Zelle vorliegenden Multicopy-Plasmiden Kointegrate zu bilden. Durch Konjugation können solche

Kointegrate unter Selektion auf den Rezipienten und auf den Resistenzmarker des Multicopy-Plasmids in einen anderen Stamm transferiert werden. Im Rezipienten zerfällt das Kointegrat wieder, aber eine Kopie von Tn1000 bleibt auf dem Multicopy-Plasmid zurück.

Die Mutagenese wurde mit pRG12 wie unter 2.19. beschrieben durchgeführt. Der Stamm GR30 (F^+pRG12) wurde mit EN75 unter Selektion auf Spectinomycin und Ampicillin gekreuzt. Die DNA Gelelektrophorese von 20 dieser Transkonjuganten ergab außer dem F-Faktor ein weiteres Plasmid, das größer als pRG12 war. Die Restriktionsanalyse zeigte, daß alle Plasmide die zusätzliche Sequenz von Tn1000 (2.4.) enthielten. Elf Insertionen lagen im Bereich der klonierten DNA, die restlichen neun lagen im Vektor pBR322. Das Ergebnis der Kartierung der Tn1000 Insertionen durch die Restriktionsanalyse ist in Abb. 15 dargestellt.

3.2.3.1.1. Eigenschaften der Tn1000 Insertionsderivate von pRG12

Die Insertionen 100-107 führten zum Verlust der Aerobactinsynthese. Weder durch Kreuzfütterung (2.9.) noch durch den chemischen Test (2.10.3.) war Aerobactin nachweisbar. Die Insertionen 114, 115 und 117 beeinträchtigten die Aerobactinsynthese nicht.
Damit ist der Aerobactin Synthesebereich auf pRG12 rechts genau zu begrenzen, das letzte Synthesegen erstreckt sich bis zur Insertion 107, ab 114 kann kein Synthesegen mehr folgen. Auf der linken Seite muß die Syntheseregion mindestens bis zur Insertion 100 reichen.
Die Tn1000 Derivate zeigten bei keinem der chemischen Tests die Synthese einer Aerobactinvorstufe (Tab. 4).

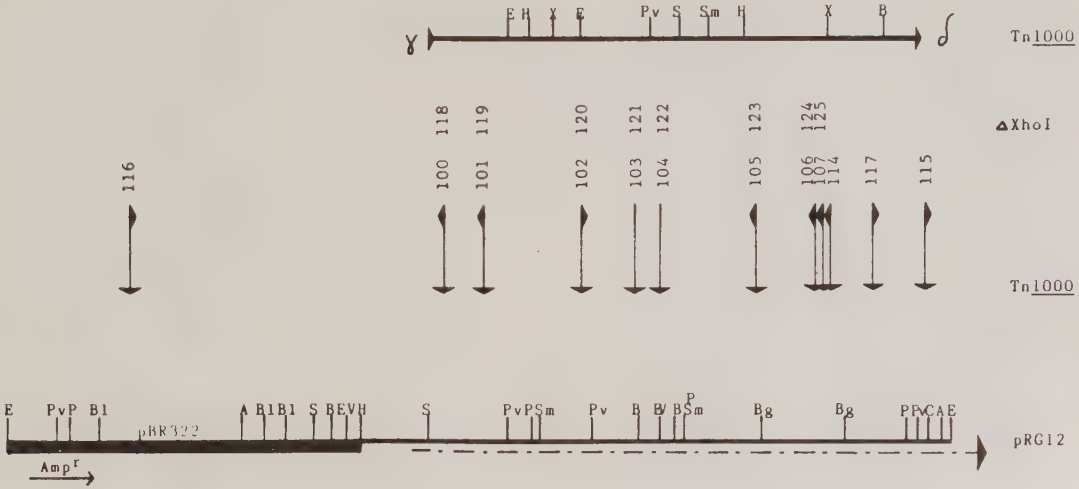


Abb. 15: Restriktionskarten von pRG12 und Tn1000. Die Zahlen 100-107, 114, 115, 116 und 117 bezeichnen die Insertionen von Tn1000. Die Pfeile stellen die Insertionsorte dar. Die seitlichen Markierungen an den Pfeilen zeigen die Orientierung des Transposons in pRG12. Die Zahlen 118-125 bezeichnen die Insertionsmutanten, bei denen das XhoI Mittelstück von Tn1000 deletiert wurde.

3.2.3.2. Mutagenese von pRG12 durch Spaltung mit Restriktionsenzymen

Bei den Tn1000 Mutanten ließen sich keine Vorstufen von Aerobactin nachweisen. Es ist denkbar, daß hieran ein polarer Effekt des Transposons auf eine in der Transkriptionsrichtung ganz hinten liegende Funktion, die die Voraussetzung für die anderen Funktionen ist, schuld ist. Deshalb wurde versucht, durch Spaltung von pRG12 mit Restriktionsenzymen Deletionen zu erzeugen, die keine polaren Effekte verursachen.

Zunächst wurde der Versuch unternommen, den möglichen polaren Effekt von Tn1000 durch Deletion des XhoI Mittelteils des Transposons zu mildern. Auf diese Weise entstanden die Plasmide pRG118-pRG125 (Abb. 15).

Außerdem wurden weitere Derivate von pRG12 erzeugt, deren Restriktionskarten in der Abb. 17 zusammengestellt sind. Im Folgenden wird kurz auf die Konstruktionen der Plasmide eingegangen. Diese Konstruktionen sind in Abb. 16 schematisch zusammengefaßt.
Durch Spaltung von pRG12 mit SalI wurde ein 1,6 Kb großes Fragment deletiert, woraus pRG108 resultierte.
Durch die Deletion des 1,0 Kb großen BglII Fragmentes aus pRG12 entstand pRG134.
Die Spaltung von pRG12 mit BglII und HindIII führte nach der Ligation mit BamHI/EcoRI geschnittenem Vektor pACYC 184 zum Plasmid pRG145.
Die Plasmide pRG111 und pRG113 entstanden nach Spaltung mit SmaI und nach anschließender Transformation mit nicht ligierter DNA. Bei pRG111 ist fast genau das 1,7 Kb große SmaI Fragment deletiert, bei pRG113 beginnt die Deletion links etwa an derselben Stelle wie bei pRG 111, geht rechts aber ungefähr 1,2 Kb weiter bis in das BglII Fragment hinein.

Von pRG111 abgeleitet ist pRG136, bei dem das 1,0 Kb große BglII Fragment zusätzlich deletiert wurde. pRG128 entstand durch partielle Spaltung von pRG12 mit BamHI, wobei eine Verdopplung des 0,4 Kb großen zentralen BamHI Fragmentes stattgefunden hat. Durch vollständige Spaltung mit BamHI entstand pRG135, bei dem das 0,4 Kb große BamHI Fragment deletiert ist und das mittelgroße BamHI Fragment in der inversen Orientierung wieder eingebaut wurde. Es gelang in mehreren Ansätzen nicht, ein pRG12 Derivat zu erhalten, bei dem nur das 0,4 Kb große BamHI Fragment deletiert ist.
Aus einer BamHI/HindIII Doppelspaltung von pRG12 und pACYC184 resultierte das Plasmid pRG132. Bei der Klonierung entstand eine Deletion im Bereich der BamHI Schnittstelle. Diese Deletion erstreckt sich etwa 1,5 Kb weit in das Vektor Plasmid hinein, betrifft die klonierte DNA aber nur marginal.

3.2.3.2.1. Eigenschaften der mit Restriktionsenzymen erzeugten Derivate von pRG12

Der Versuch, den polaren Effekt von Tn1000 bei pRG100-pRG107 durch Deletion des Tn1000 XhoI Fragmentes zu mildern, war erfolglos. Die chemischen Test verliefen auch mit den Deletionsderivaten pRG118-pRG125 (Abb. 15) negativ (Tab. 4).

Die SalI Deletion bei pRG108 führte dazu, daß weder Aerobactin noch eine Vorstufe nachweisbar war. Das zeigt, daß die Aerobactinregion auf der linken Seite von pRG12 bis über die SalI Schnittstelle hinüberreichen muß. Durch die Deletion ist vermutlich die Aerobactin-Kontrollregion betroffen, da die Transkriptionsrichtung von links nach rechts verläuft.

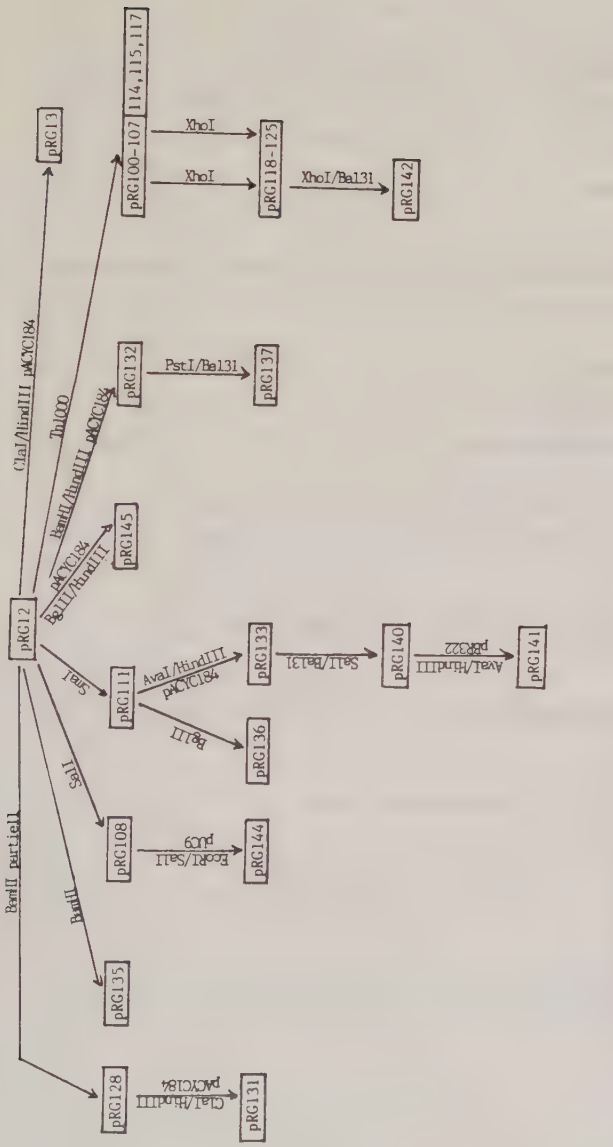


Abb. 16: Schematische Darstellung der Konstruktionen, die zu den Deletionsderivaten von pRG12 führten

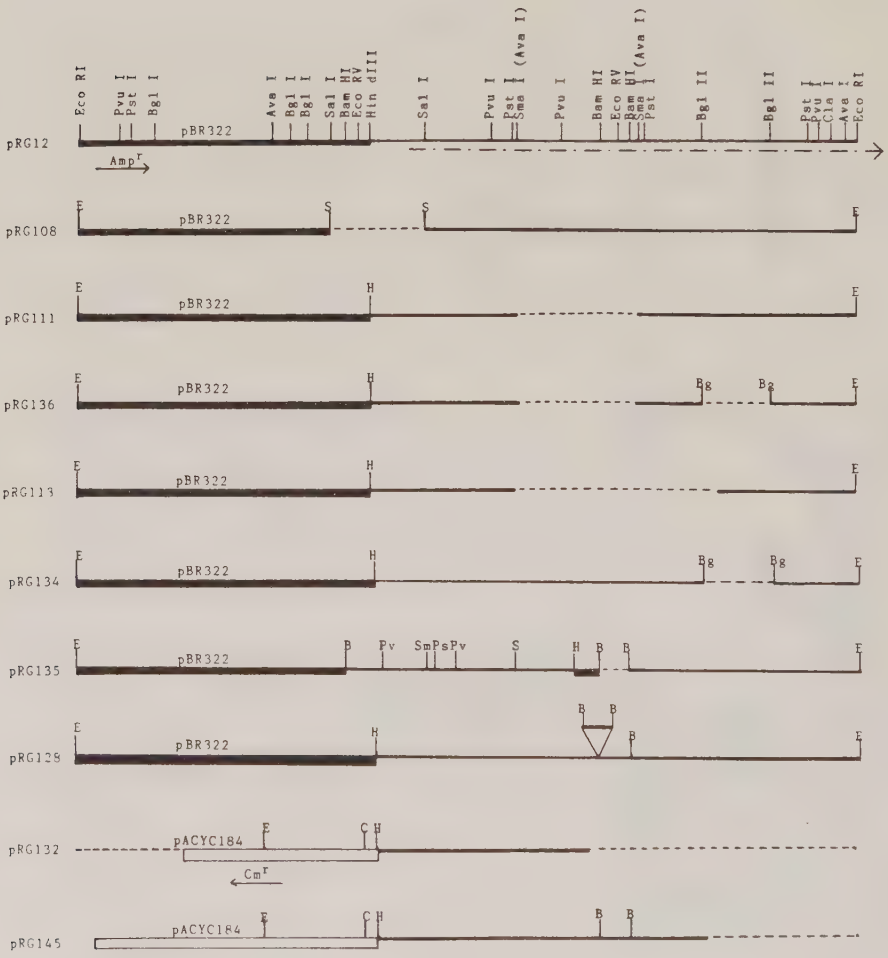


Abb. 17: Restriktionskarten der in Kapitel 3.2.3.2. beschriebenen Deletionsderivate von pRG12

Die Deletion des SmaI Fragmentes bei pRG111 führte ebenfalls zum Verlust der Aerobactinsynthese, doch war bei diesem Klon eine Vorstufe von Aerobactin im chemischen Test auf Hydroxylamin-Funktionen (2.10. 2.) nachweisbar. F. Engelbrecht konnte zeigen, daß es sich bei dieser Substanz um 6-N-Hydroxylysin handelt (27).
Da die Deletionsmutanten pRG113 und pRG136 diese Vorstufe nicht mehr synthetisieren konnten, muß das Gen der N-Hydroxylase rechts der Deletion 111 im Bereich des 1,0 Kb großen BglII Fragmentes lokalisiert sein.
Auch die Plasmide pRG134 und pRG145, die nur Mutationen in diesem Bereich des BglII Fragmentes aufweisen, zeigen dadurch, daß sie kein Aerobactin und keine Vorstufe produzierten, daß ganz hinten in der Transkriptionsreihenfolge die erste Synthesefunktion codiert wird. Diese Vermutung war ja schon bei den Tn1000 Mutanten gemacht worden. pRG134 und pRG145 entsprechen damit den Tn1000 Insertionen 106 und 107.
Stämme mit den Plasmiden pRG128 und pRG135 produzierten eine weitere Vorstufe von Aerobactin. Bei ihnen war der Kreuzfütterungstest auf Aerobactin (2.9.) negativ, aber der chemische Test auf Hydroxamsäuren (2.10.3.) positiv. F. Engelbrecht zeigte, daß es sich bei dieser Substanz um die Aerobactinvorstufe 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin handelt (27). Bei pRG128 wurde also durch die Verdopplung des kleinen BamHI Fragmentes ein Gen inaktiviert, das an der peptidischen Verknüpfung der zu Hydroxamsäuren umgesetzten Lysinreste mit Citrat beteiligt ist. Bei pRG135 ist durch die Deletion des kleinen BamHI Fragmentes derselbe

Genlocus inaktiviert worden. Daß bei pRG135 trotz der Inversion eines seiner Fragmente und der damit erfolgten Abkopplung des Hydroxylasegens von der Transkriptionseinheit überhaupt ein Zwischenprodukt synthetisiert wird, kann damit erklärt werden, daß der Tet-Promotor von pBR322 durch die Inversion direkt vor das Gen der Hydroxylase gesetzt wurde, der dann für die Transkription des Hydroxylasegens verantwortlich sein könnte.
Das Plasmid pRG132 vermittelt weder die Produktion von Aerobactin noch von einer Vorstufe; dies ist nicht verwunderlich, da dem Plasmid ja ebenfalls der Bereich des ersten Synthesegens fehlt.
In der Tab. 4 sind diese Eigenschaften der Plasmide nochmals zusammengestellt.

Tab. 4: Physiologische Eigenschaften von Stämmen mit Derivaten von pRG12

Plasmid	Hydroxylamin	Hydroxamat	Aerobactin
pRG12	-	++	++
pRG100-107	-	-	-
pRG118-125	-	-	-
pRG108	-	-	-
pRG132	-	-	-
pRG111	++	-	-
pRG113	-	-	-
pRG136	-	-	-
pRG134	-	-	-
pRG128	-	++*	-
pRG135	-	++*	-
pRG145	-	-	-

++ bei den chemischen Tests OD_{520} größer 1
++ beim Aerobactinnachweis Durchmesser des Wachstumshofs größer als 1,0 cm

* später dargestellte Daten (3.2.5.1.) zeigen, daß diese Klone zwei verschiedene im Test auf Hydroxamsäuren positive Aerobactinvorstufen synthetisieren

Der Nachweis von 6-N-Hydroxylysin und von 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin als Vorstufen der Aerobactinbiosynthese zeigt, daß Lysin zunächst N-hydroxyliert wird, dann folgt die N-Acetylierung, und zuletzt werden diese modifizierten Lysinreste mit Citrat peptidisch verknüpft. Die Gene dieser für die drei Reaktionen verantwortlichen Enzyme lassen sich durch die bis jetzt vorhandenen Mutanten bereits ungefähr lokalisieren. Die Plasmide pRG113 und pRG136 zeigten, daß das Hydroxylasegen aerA im Bereich des kleinen BglII Fragmentes von pRG12 ganz hinten in der Transkriptionsreihenfolge liegt. Die Plasmide pRG128 und pRG135 zeigten den Genlocus der Lyase aerC im Bereich des kleinen BamHI Fragmentes auf. Die Deletion 111 betraf auch das Acetylasegen aerB, denn pRG111 vermittelte nur die Synthese von 6-N-Hydroxylysin. Aus Platzgründen müßte aerB links von aerC auf pRG12 lokalisiert sein.

3.2.3.2.2. Komplementationsversuche mit pRG12 Derivaten

Zur Überprüfung der unter 3.2.3.2.1. festgestellten Anordnung der Synthesegene wurden die pRG12 Derivate miteinander komplementiert. Für diese Komplementationen war es erforderlich, daß einige der klonierten Sequenzen in den mit pBR322 kompatiblen Vektor pACYC184 umkloniert wurden. Deshalb wurde das Plasmid pRG111 durch eine AvaI/HindIII Spaltung in pACYC184 umkloniert. Es resultierte das Plasmid pRG133, das im chemischen Test auf Hydroxylamin-Funktionen ebenfalls positiv war. Der Hydroxamatklon pRG128 wurde durch eine ClaI/HindIII Doppelspaltung in pACYC184 umkloniert; der daraus entstandene Klon pRG131 war im chemischen Test auf Hydroxa-

mat positiv (Abb. 16 und Tab. 5).

Tab. 5: Ergebnisse der Komplementationsversuche mit pRG12 Derivaten

Plasmide	Hydroxylamin	Hydroxamat	Aerobactin
pRG133	++	-	-
pRG131	-	++*	-
pRG111/pRG132	-	++*	-
pRG128/pRG132	-	++*	-
pRG134/pRG133	-	++	++
pRG134/pRG131	-	++	++
pRG101/pRG133	+	-	-
pRG101/pRG131	-	++	(+)
pRG102/pRG133	+	-	-
pRG102/pRG131	-	++	(+)
pRG103/pRG133	-	++*	-
pRG103/pRG131	-	++*	-
pRG104/pRG133	-	++*	-
pRG104/pRG131	-	++*	-
pRG106/pRG133	-	++	++
pRG106/pRG131	-	++	++
pRG128/pRG145	-	++	++

- negativ
+ beim chemischen Test OD_{520} kleiner als 1,0
++ beim chemischen Test OD_{520} größer als 1,0
(+) beim Wachstumstest Wachstumshof kleiner als 0,5 cm im Durchmesser
++ beim Wachstumstest Wachstumshof größer als 1,0 cm im Durchmesser

* später dargestellte Daten (3.2.5.1.) zeigen, daß diese Klone zwei verschiedene im Test auf Hydroxamsäuren positive Aerobactinvorstufen synthetisieren

Die Lokalisierung von aerA wurde durch die Komplementationen von pRG134 und pRG106 mit pRG133 bestätigt. Das 6-N-Hydroxylysin von pRG133 wurde von diesen beiden Klonen zu Aerobactin weiterverarbeitet, sie sind also nur im aerA Gen defekt. Natürlich konnten sie auch das Hydroxamat

von pRG131 zu Aerobactin weiterverarbeiten.

Die Lokalisierung von aerB auf der linken Seite des kleinen zentralen BamHI Fragmentes wurde durch die Komplementation von pRG111 mit pRG132 bewiesen. Das 6-N-Hydroxylysin von pRG111 kann von dem nur die Sequenz links des kleinen BamHI Fragmentes umfassenden Klon pRG132 zu 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin weiterverarbeitet werden. Das Plasmid pRG132 codiert also für aerB. Die Tn1000 Insertionen 103, 104 und 106 konnten das Acetylasegen ebenfalls komplementieren, sie liegen ja auch in einem Bereich außerhalb der in pRG132 enthaltenen Sequenz. Nicht komplementieren konnten dagegen die Insertionen 101* und 102. Bei diesen Plasmiden ist Tn1000 offensichtlich im Bereich des aerB Gens inseriert.

Die Lokalisierung von aerC im Bereich des kleinen zentralen BamHI Fragmentes wurde durch die Komplementationen von pRG131 mit den Tn1000 Derivaten pRG103 und pRG104 bestätigt, die im Bereich des BamHI Fragmentes inseriert sind. Das Hydroxamat von pRG131 konnte von ihnen nicht zu Aerobactin weiterverarbeitet werden. Insertionen weiter rechts, wie bei pRG105 und pRG106 konnten die aerC Funktion wieder voll komplementieren. Auch die im Bereich von aerB mutierten Plasmide pRG101 und pRG102 zeigten eine schwache Komplementation des direkt folgenden aerC Gens. Das Plasmid pRG132 konnte das aerC Gen nicht komplementieren.

Die Komplementationsstudien bestätigen also das vorgelegte Modell, wonach in der Transkriptionsreihenfolge zunächst das Gen der N-Acetylase aerB kommt, dann folgt der aerC Locus. Als letztes Synthesegen folgt das aerA Gen, dessen Genprodukt die erste Reaktion in der Aerobactinbiosynthese codiert, die N-Hydroxylierung des Lysins.

*später wird gezeigt, daß es sich bei 101 um einen polaren Effekt auf das aerB Gen handelt (3.2.4.1.)

3.2.4. Identifizierung der plasmidcodierten Proteine im Minizellsystem

Die Abb. 18 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der radioaktiv markierten Proteine, die von pBR322, den Tn1000 Derivaten von pRG12 und von pRG111 und pRG128 codiert sind.
Deutlich zu sehen sind außer den von pBR322 codierten Proteinen, vornehmlich der ß-Laktamase und ihrer Proform im Bereich von 27 Kd bis 32 Kd, zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 60 Kd und 50 Kd. Diese Proteine werden bei pRG111 und bei pRG128 exprimiert, was bedeutet, daß die Deletion 111 und die Insertion 128 nicht im für diese Proteine codierenden Bereich liegen. Auch bei den Insertionen 120 und 121, die ja beide im Bereich der Deletion 111 lokalisiert sind, sind beide Proteine sichtbar.
Bei den Plasmiden pRG118 und pRG119 ist das 60 Kd Protein nicht zu sehen, nur das 50Kd Protein ist sichtbar. Bei den Insertionen 123 und 124 ist dagegen nur das 60 Kd Protein sichtbar, das 50 Kd Protein ist verschwunden. Bei allen Mutanten ist ein ca. 45 Kd großes Protein sichtbar, das beim Vektor pBR322 fehlt.

Die Lokalisierung der Gene der 60 Kd und 50 Kd Proteine kann damit festgelegt werden:
Das 60 Kd Protein ist bei der Deletion 111 noch vorhanden und muß damit links oder rechts der Deletion codiert sein. Da das Protein bei den Insertionen 118 und 119 verschwunden ist, liegt das Gen links der Deletion im Bereich der Insertionen. Da für ein 60 Kd großes Protein eine codierende Sequenz von gut 1,6 Kb erforderlich ist, muß das Gen über die SalI Schnittstelle in der klonierten DNA von pRG12 hinüberreichen (Abb. 21).

Das 50 Kd Protein muß dementsprechend rechts von der Deletion 111 im Bereich der Insertionen 123 und 124 codiert sein, da bei diesen Insertionen das Protein verschwunden ist. Auch bei der Deletion des BglII Fragmentes bei pRG134 verschwindet das 50 Kd Protein (nicht dargestellt).

Um den Molekulargewichtsbereich, der von der ß-Laktamase und ihrer Proform überdeckt wird, zu untersuchen, wurden die in pACYC184 umklonierten Plasmide untersucht (Abb. 19,20). Auch pRG12 wurde zu diesem Zweck durch eine ClaI/HindIII Doppelspaltung in pACYC184 umkloniert. Der hieraus resultierende Klon pRG13 (Abb. 23) war wie pRG12 sowohl im Kreuzfütterungstest als auch im chemischen Hydroxamatnachweis positiv.

Beim Vektor pACYC184 war in erster Linie die Chloramphenicolacetyltransferase mit einem Molekulargewicht von 22 Kd sichtbar.
Bei pRG13 traten außer den beiden 60 Kd und 50 Kd Proteinen noch zwei weitere Proteine mit 35 Kd und 27 Kd auf. Dieselben Proteine waren beim Hydroxamatklon pRG131 sichtbar. Beim 6-N-Hydroxylysinklon pRG133 waren die 60 Kd und 50 Kd Proteine sichtbar, das 35 Kd und das 27 Kd Protein waren verschwunden. Stattdessen traten zwei neue Proteine mit einem Molekulargewicht von 31 Kd und 32 Kd auf. Bei pRG132 waren nur noch das 60 Kd und das 35 Kd Protein vorhanden. Beim Plasmid pRG145 mit seiner Deletion ganz rechts in pRG12 verschwanden das 27 Kd und das 50 Kd Protein.

Mit diesen Ergebnissen lassen sich die zwei neuen 27 Kd und 35 Kd großen Proteine bei pRG13 lokalisieren. Da pRG132 außer dem 60 Kd auch das 35 Kd Protein aufweist, bei pRG133 dieses Protein aber verschwunden ist,

muß das 35 Kd Protein rechts des 60 Kd Proteins im Bereich der Deletion 111 codiert sein.
Das 27 Kd Protein von pRG13 und pRG131 muß ganz rechts im Bereich der Deletion 145 codiert sein, denn pRG145 exprimiert dieses Protein nicht mehr. Möglicherweise stellt das 27 Kd Protein eine verkürzte Polypeptidkette des in diesem Bereich codierenden äußeren Membranrezeptors Iut dar.
Auch die 31 Kd bzw. 32 Kd großen Proteine bei pRG133 könnten Teile des Iut Proteins und seiner Proform sein, denn pRG133 wurde mit AvaI kloniert, das auf pRG12 etwa 150 Basenpaare weiter rechts schneidet als ClaI, mit dem pRG13 und pRG131 kloniert worden waren. Damit müßte das von dieser Genregion codierte Protein bei pRG133 tatsächlich einige tausend Dalton größer sein als bei pRG13 bzw. pRG131.

Damit ergibt sich das in Abb. 21 dargestellte Bild:
In der Transkriptionsrichtung folgt auf ein Gen, das für ein 60 Kd großes Protein codiert, ein Gen für ein 35 Kd Protein. Nach einem mindestens 1 Kb großen Zwischenraum, dem kein Genprodukt zugeordnet werden konnte, folgt im Bereich des BglII Fragmentes das Gen für das 50 Kd große Protein. Zuletzt kommt vermutlich ein Teil des Rezeptorgens iut, das für verkürzte Polypeptidketten des Iut Proteins codiert.

3.2.4.1. Korrelation von Genfunktion, Genlocus und Genprodukt

Bei den Insertionen 123 und 124 und bei der Deletion des BglII Fragmentes bei pRG134 wurde das erste Synthesegen, das für die N-Hydroxylase codiert, inaktiviert. Bei diesen

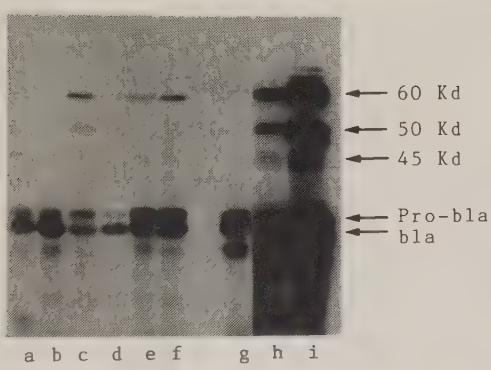


Abb. 18: Autoradiographie der im Minizellsystem mit ^{14}C radioaktiv markierten Proteine der Plasmide pRG118(a), pRG119(b), pRG120(c), pRG121(d), pRG123(e), pRG124(f), pBR322(g), pRG111(h) und pRG128(i) nach einer PAGE mit 11% Acrylamid. bla und Pro-bla bezeichnen die ß-Laktamase und ihre Proform.

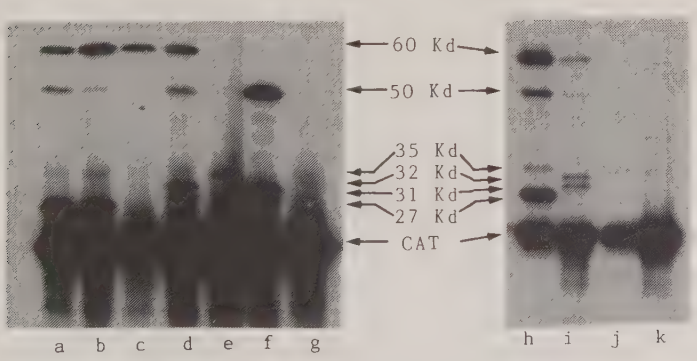


Abb. 19 und 20: Autoradiographien der im Minizellsystem mit ^{35}S radioaktiv markierten Proteine der Plasmide pRG13(a/h), pRG131(b), pRG132(c), pRG133(d/i), pRG137(e/j), pRG140(f), pRG145(k) und pACYC184(g). CAT kennzeichnet die Chloramphenicolacetyltransferase. Die PAGE wurde mit 14% Acrylamid durchgeführt.

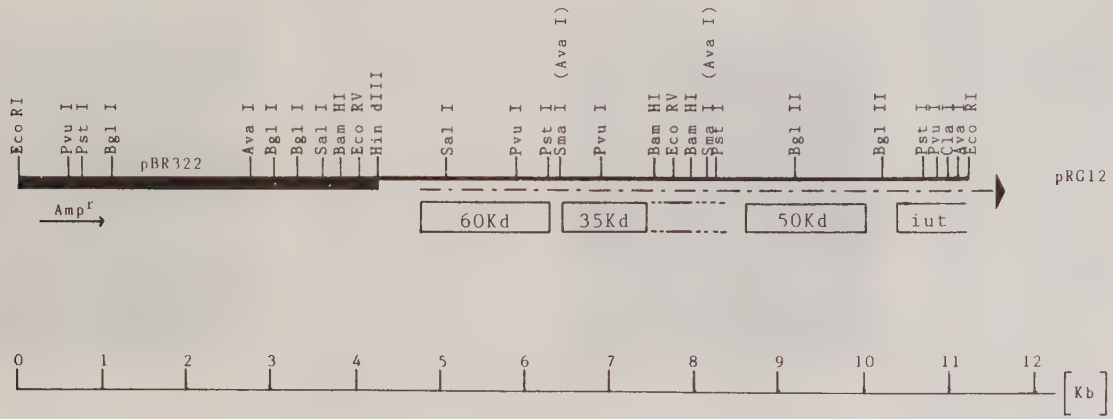


Abb. 21: Restriktionskarte von pRG12. Als gestrichelter Pfeil eingezeichnet ist die Transkriptionsrichtung. Als Kästchen dargestellt sind die für die 60 Kd, 50 Kd, 35 Kd und 27 Kd bzw. 31 Kd (iut) codierenden Bereiche auf pRG12. Zwischen dem Gen des 35 Kd Proteins und dem Gen des 50 Kd Proteins ist ein etwa 1 Kb großer Bereich, für den kein Genprodukt gefunden werden konnte.

Mutanten wurde das 50 K Protein im Minizellsystem nicht mehr exprimiert. Damit ist es sehr wahrscheinlich, daß das 50 K Protein die vom aerA Locus codierte N-Hydroxylase darstellt.

Für den aerC Locus, der für die Lyase codiert, konnte durch die Minizellanalyse kein Genprodukt nachgewiesen werden.

Das Plasmid pRG132 konnte die N-Acetylase komplementieren, muß also den aerB Locus enthalten. pRG132 codiert jedoch für zwei Proteine, das 60 Kd und das 35 Kd große Protein.
Die Analyse der Insertionen 119 und 120, die ja beide die Acetylase nicht mehr komplementieren konnten, ergab, daß die Insertionen in zwei verschiedenen Genen lokalisiert sein müssen. Bei pRG119 verschwindet das 60 Kd Protein, das bei pRG120 noch vorhanden ist. Die Kartierung der Insertion 120 rechts von der linken SmaI Schnittstelle in pRG12 zeigt, daß das Transposon bei pRG120 vermutlich in das Gen des 35 Kd Proteins inseriert ist. Leider beeinträchtigt die ß-Laktamase bei den Autoradiographien gerade diesen Bereich.
Wahrscheinlich ist deshalb das 35 Kd Protein die N-Acetylase. Daß die Insertion 119 diese Funktion ebenfalls nicht komplementieren konnte, könnte durch den polaren Effekt auf das direkt benachbarte aerB Gen erklärt werden.
Es könnte aber auch sein, daß für die Acetylase-Funktion das 60 Kd Protein ebenfalls erforderlich ist.
Da alle bislang beschriebenen Mutanten die Genregion des 60 Kd Proteins besitzen, könnte es auch sein, daß dieses Protein an den anderen beiden bis jetzt charakterisierten Reaktionen beteiligt ist.

3.2.5. Konstruktion weiterer pRG12 Derivate durch Mutagenese mit Bal31 und durch Umklonierung in den Expressionsvektor pUC9

Wie in Kapitel 3.2.4.1. dargestellt worden war, ist ein für ein 60 Kd großes Protein codierendes Gen im Bereich des Aerobactinsystems bei allen bislang beschriebenen Derivaten von pRG12 vollständig vorhanden. Wenn dieses Gen ebenfalls eine Synthesefunktion codiert, könnte diese an allen drei bis jetzt beschriebenen Reaktionen beteiligt sein. Zur Untersuchung der Funktion dieses Gens war die Neukonstruktion von Mutanten in diesem Gen erforderlich.
Es wurde versucht, diesen Genbereich aus dem 6-N-Hydroxylysin Klon pRG133 zu deletieren, um eine mögliche Funktion bei der N-Hydroxylierung zu erfassen. Außerdem wurde versucht, den das Acetylasegen aerB komplementierenden Klon pRG132 soweit zu verkleinern, daß nur noch das Gen des 35 Kd Proteins vorhanden ist. Mit diesem Klon sollte eine Funktion des 60 Kd Proteins bei der N-Acetylierung untersucht werden. Schließlich wurde versucht, pRG12 Derivate zu erzeugen, denen nur der Genbereich des 60 Kd Proteins fehlt, um eine Beteiligung dieses Gens an der peptidischen Verknüpfung der modifizierten Lysinreste mit Citrat erkennen zu können.

Zur Konstruktion eines Deletionsderivats von pRG133 wurde dieses Plasmid an seiner einzigen SalI Schnittstelle, die im Genbereich des 60 Kd Proteins kartiert, linearisiert. Dann wurde wie unter 2.15. beschrieben eine Deletion mit Bal31 erzeugt. Die Plasmide von 30 Transformanten in den Stamm H1443 wurden isoliert und mit SalI geschnitten. Bei fast allen Isolaten war die SalI Schnittstelle nicht mehr vorhanden. Stellvertretend wurde das Plasmid pRG140 ausgewählt, weil bei diesem Plasmid, wie die Abb. 23 zeigt, nahezu der gesamte Bereich des Gens

des 60 Kd Proteins deletiert ist.

In ähnlicher Weise wurde bei pRG132 vorgegangen, nur daß bei diesem Ansatz mit PstI linearisiert wurde. Bei dem stellvertretend ausgewählten Plasmid pRG137 ist ebenfalls fast der gesamte Bereich des Gens des 60 Kd Proteins deletiert.

Zur Konstruktion von 60 Kd defekten pRG12 Derivaten wurden zwei verschiedene Wege eingeschlagen:
Im ersten Ansatz wurde wieder eine Deletion mit Bal31 im Bereich des Gens des 60 Kd Proteins erzeugt. Um bei pRG12 die Möglichkeit zu bekommen, die DNA in diesem Gen an einer singulären Schnittstelle linearisieren zu können, wurde von der Insertionsmutanten pRG118 ausgegangen. pRG118 ist ja aus der Tn1000 Insertion 100 entstanden, indem das Tn1000 XhoI Fragment deletiert worden ist. Damit hat pRG118 nur noch eine XhoI Schnittstelle umgeben von Resten der Tn1000 DNA mitten im Gen des 60 Kd Proteins. Nun wurde mit XhoI linearisiert und Bal31 eingesetzt (Abb. 22). Es gelang nicht, eine Mutante zu finden, bei der nur das Gen des 60 Kd Proteins deletiert wurde; stattdessen wurde pRG142 isoliert, bei dem die Deletion rechts kurz vor der SmaI Schnittstelle und damit kurz vor dem Bereich des Gens des 35 Kd Proteins aufhört, links aber über den Aerobactin Promotorbereich hinaus in den Vektor pBR322 hineinverläuft.
In einem zweiten Ansatz wurde das EcoRI/SalI Fragment von pRG108 (Abb. 17) in den Expressionsvektor pUC9 kloniert. Die Lokalisierung der Genprodukte auf pRG12 ergab, daß das Gen des 60 Kd Proteins über die SalI Schnittstelle hinüberreichen muß (Abb. 21). Das bedeutet, daß bei dem durch die Umklonierung erhaltenen Plas-

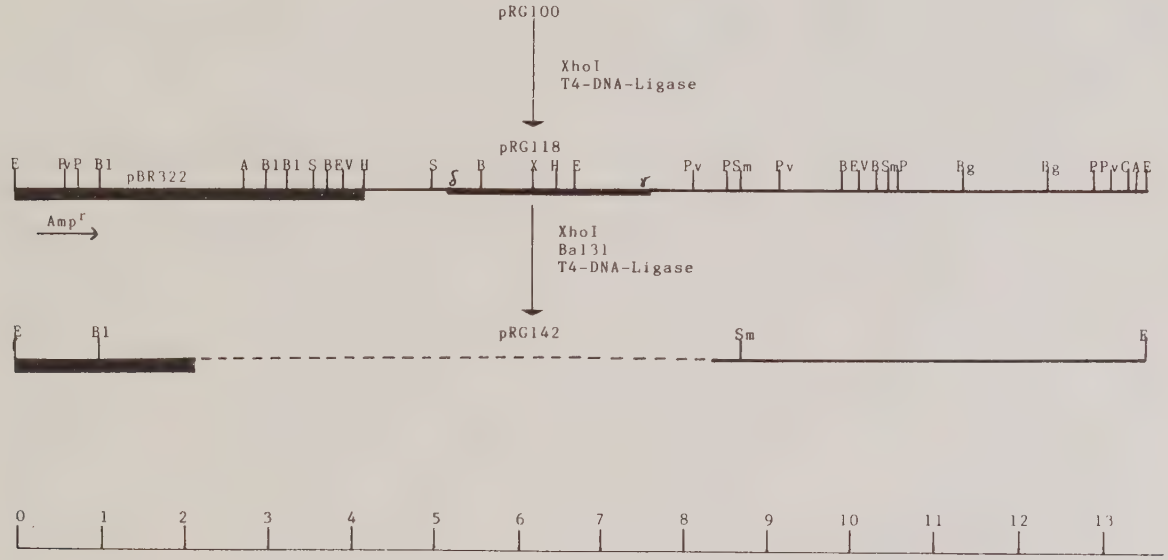


Abb. 22: Vorgehensweise bei der Konstruktion des pRG12 Deletionsderivats pRG142. Die mit γ und δ bezeichnete Seuqenz stellt den Rest von Tn1000 nach Deletion des XhoI Fragmentes des Transposons dar.

mid pRG144 das Gen des 60 Kd Proteins nur unvollständig enthalten sein kann.

Diese Konstruktionen sind in der Abb. 16 schematisch zusammengefaßt. Die Restriktionskarten der neuen pRG12 Deletionsderivate sind in Abb. 23 dargestellt.

3.2.5.1. Eigenschaften der mit Bal31 und durch Umklonierung erzeugten Derivate von pRG12 und Komplementationsstudien mit diesen Plasmiden

Zur Überprüfung, ob das 60 Kd Protein an der N-Hydroxylierung beteiligt ist, wurde das pRG133 Derivat pRG140 erzeugt. Bakterien mit diesem Plasmid produzierten nach wie vor 6-N-Hydroxylysin. Das bedeutet, daß das 60 Kd Protein bei der N-Hydroxylierung unbeteiligt ist.

Zellen mit pRG137 zeigten, wie auch schon mit pRG132, keine Produktion von Aerobactin oder von Vorstufen. Zur Überprüfung einer Funktion des 60 Kd Proteins bei der N-Acetylierung wurde pRG137 mit dem 6-N-Hydroxylysin produzierenden Klon pRG141 gemeinsam in einen Stamm transformiert. Beide Plasmide codieren nicht mehr für das 60 Kd Protein. pRG141 entstand aus einer AvaI/HindIII Umklonierung in den mit pACYC184 kompatiblen Vektor pBR322 und hatte denselben Phänotyp wie pRG140. Da der resutlierende Stamm das 6-N-Hydroxylysin von pRG141 zum Hydroxamat weiterverarbeiten konnte, kann das 60 Kd Protein auch bei der N-Acetylierung keine Rolle spielen.

Die Plasmide pRG142 und pRG144 konnten kein Aerobactin mehr synthetisieren, wie durch den Kreuzfütterungstest gezeigt wurde. Sie produzierten die Vorstufe 6-N-Acetyl-

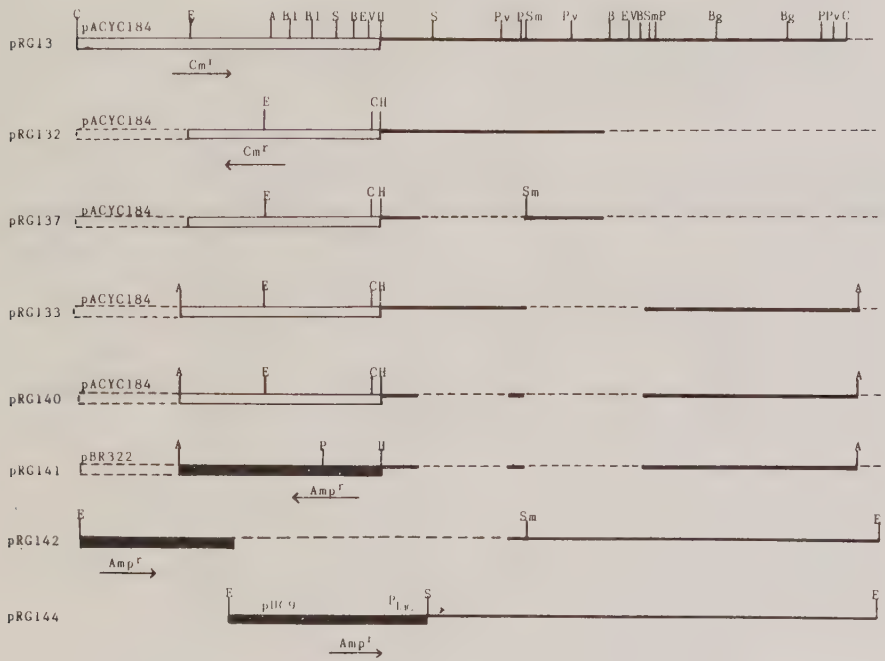


Abb. 23: Restriktionskarten der in den Kapiteln 3.2.3.2.2., 3.2.4. und 3.2.5. beschriebenen Plasmide.

6-N-Hydroxylysin.
Bei pRG142 wird offenbar von einem Promotor des Vektors pBR322 in die inserierte DNA Sequenz hineingelesen. Bei pRG144 wird vermutlich vom lac Promotor des Expressionsvektors pUC9 gelesen, ohne den ja die nachfolgende Sequenz wie bei pRG108 nicht transkribiert wurde.

Die Produktion der Aerobactinvorstufe 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin bei einer Mutation im Gen des 60 Kd Proteins beweist, daß tatsächlich ein viertes Gen an der Aerobactinbiosynthese beteiligt ist. Dieses Gen, aerD genannt, muß ebenfalls an der peptidischen Verknüpfung von 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin mit Citrat beteiligt sein, wie auch der durch die Insertionen 103 und 128 markierte Genlocus aerC.

Durch die Komplementation von pRG142 mit anderen Plasmiden wurde dieser Befund bestätigt (Tab. 6):
Wurde pRG142 mit Plasmiden zusammengegeben, die ein intaktes Gen für das 60 Kd Protein besitzen, wie z.B. mit pRG131, pRG132 und pRG133, dann wird die aerD Funktion komplementiert, und Aerobactin kann wieder synthetisiert werden. Wurde pRG142 aber mit pRG137 zusammengebracht, das selbst kein intaktes Gen des 60 Kd Proteins besitzt, dann kann nach wie vor kein Aerobactin synthetisiert werden.

An der Synthese von Aerobactin sind also vier Gene beteiligt, aerA an der N-Hydroxylierung, aerB an der N-Acetylierung und aerC und aerD an der peptidischen Verknüpfung der zu Hydroxamsäuren umgesetzten Lysinreste mit Citrat.
Es ist nun denkbar, daß für eine Enzymfunktion zwei Polypeptidketten nötig sind, es könnte aber auch sein, daß die aerC und aerD Funktionen zwei getrennte Synthesereaktionen katalysieren. Aufgrund dieser Überlegungen

Tab. 6: Produktion von Aerobactin und Aerobactinvorstufen bei pRG12 Derivaten und bei Komplementationsversuchen

Plasmid	Hydroxylamin OD_{520}	Hydroxamat OD_{520}	Aerobactin
pRG140	0,8	-	-
pRG141	1,0	-	-
pRG137	-	-	-
pRG142	-	0,62	-
pRG144	-	0,6	-
pRG142/pRG132	-	0,2	+
pRG142/pRG137	-	0,6	-
pRG142/pRG133	-	0,72	++
pRG142/pRG131	-	1,1	++

- negativ
+ Durchmesser Wachstumshof von EN41 etwa 0,5 cm
++ Durchmesser Wachstumshof von EN41 größer als 1 cm

konnte F. Engelbrecht bei Bakterien mit dem in aerC defekten Plasmid pRG128 außer dem 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin noch eine zweite im chemischen Test auf Hydroxamsäuren positive Substanz, das 2-N-Citryl-6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin, nachweisen (27). Bei Bakterien mit dem in aerD defekten Plasmid pRG142 konnte dagegen nur das 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin gefunden werden. Daraus muß geschlossen werden, daß das von aerD codierte 60 Kd Protein die erste peptidische Verknüpfung von 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin mit Citrat katalysiert. Die zweite Peptidbindung mit 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin und 2-N-Citryl-6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin als Substraten wird dann vom bislang nicht identifizierten aerC Genprodukt unter Ausbildung von Aerobactin geknüpft. Diese Syntheseabfolge ist in Abb. 24 dargestellt.

3.2.5.2. Analyse der mit Bal31 mutagenisierten pRG12 Derivate im Minizellsystem

Die Abb. 19 und 20 in Kapitel 3.2.4. zeigen die Autoradiographien der elektrophoretisch aufgetrennten von pRG140 und pRG137 codierten radioaktiv markierten Proteine.
Bei pRG140 ist im Vergleich zum Ausgangsplasmid pRG133 zu sehen, daß durch die mit Bal31 erzeugte Deletion tatsächlich das 60 Kd große Protein verschwunden ist. Das 50 Kd Protein und die 31 Kd und 32 Kd Proteine, die möglicherweise verkürzte Polypeptidketten des Iut Proteins darstellen, sind noch vorhanden. Auch dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, daß das 50 Kd Protein die N-Hydroxylase ist.
Auch bei pRG137 ist erwartungsgemäß das 60 Kd Protein verschwunden und nur noch das 35 Kd Protein sichtbar, das damit eindeutig als aerB Genprodukt und als N-Acetylase identifiziert ist.
Es gelang in mehreren Ansätzen nicht, die Genprodukte von pRG142 und pRG144 im Minizellsystem sichtbar zu machen.

In Abb. 25 sind alle Ergebnisse dargestellt:
In der Transkriptionsreihenfolge kommt zunächst das aerD Gen, das für ein 60 Kd Protein codiert und für die erste Ausbildung einer Peptidbindung eines modifizierten Lysinrestes mit Citrat verantwortlich ist. Es folgt das aerB Gen mit dem 35 Kd Protein als Genprodukt, das die N-Acetylierung von 6-N-Hydroxylysin katalysiert. Als drittes Synthesegen folgt aerC, dessen bislang nicht identifiziertes Genprodukt die Knüpfung der zweiten Peptidbindung unter Bildung von Aerobactin katalysiert. Das letzte Synthesegen ist aerA,

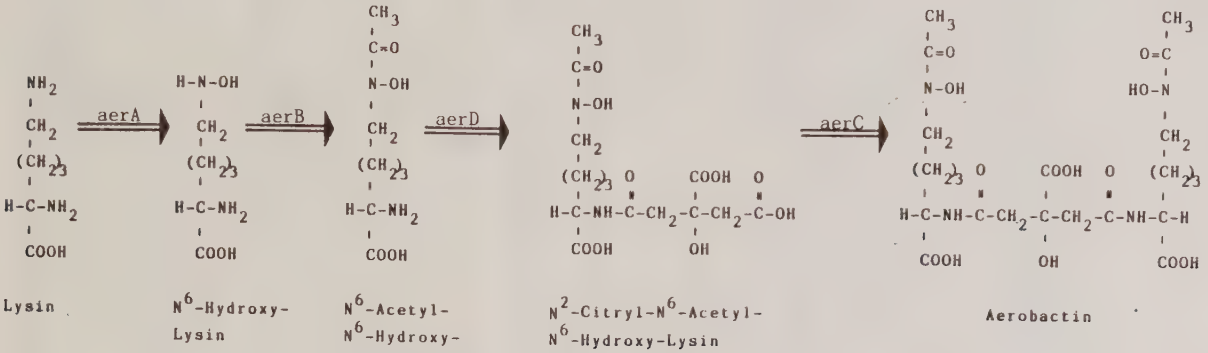


Abb. 24: Biosyntheseweg des Aerobactins

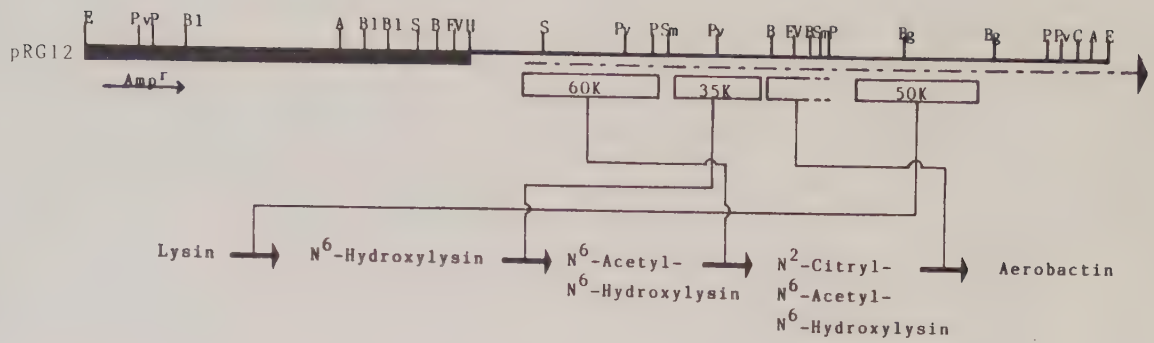


Abb. 25: Zusammenfassende Darstellung der Aerobactinsyntheseregion von pColV-K311/11. Die ungefähre Position der Genloci ist durch die Darstellung ihrer Genprodukte, die als Kästchen mit dem jeweiligen Molekulargewicht darin gezeichnet sind, festgelegt. Jeder Genlocus ist mit mit der Synthesereaktion verbunden, für den er verantwortlich ist. Die Transkriptionsrichtung ist als gestricheltelter Pfeil dargestellt.

das für ein 50 Kd großes Protein codiert, das die erste Synthesereaktion, die N-Hydroxylierung des Lysins, katalysiert.

4. DISKUSSION

4.1. Restriktionsanalyse von pColV-K311/11 und seinen Derivaten

Das Aerobactinsystem von pColV-K311/11 wurde mit Hilfe von Tn*5*-, Mud1- und Deletionsmutanten untersucht. Es konnten zwei Genbereiche identifiziert werden, die denen des Plasmides pColV-K30 entsprechen (98). Mutationen in dem einen Genbereich führten zum Verlust der Aerobactinsynthese; dieser Bereich wurde *aer* genannt. Mutanten in dem anderen Genbereich konnten kein Aerobactin mehr aufnehmen und waren resistent gegen Cloacin DF13. Diese Mutationen betrafen das Gen des Aerobactinrezeptors in der äußeren Membran, das in Anlehnung an die Ergebnisse von pColV-K30 *iut* genannt wurde (98).
Die Restriktionsanalyse dieser Mutanten ergab, daß alle Mutationen in einem 7 Kb bis 8 Kb großen Bereich von pColV-K311/11 kartieren. Die Gene des Aerobactinsystems liegen also eng benachbart vor. Die Insertionsmutationen in der Syntheseregion *aer* haben einen polaren Effekt auf die Expression des *iut* Gens, was sich in einer geringeren Sensitivität dieser Mutanten gegen Cloacin DF13 äußerte. Die Transkriptionsrichtung an den Insertionsstellen der Mud1 Phagen konnte durch die Bestimmung der Orientierung der Mud1 Phagen im Aerobactinsystem ermittelt werden. Es zeigte sich, daß die Transkriptionsrichtung an fünf untersuchten Stellen sowohl im *aer* als auch im *iut* Bereich gleich ist. Sie verläuft von der Syntheseregion hin zum Rezeptorgen. Die enge Kopplung der Aerobactingene, der polare Effekt von *aer* Mutationen auf die Expression von *iut* und die Transkriptionsrichtung lassen vermuten,

daß das Aerobactinsystem von pColV-K311/11 ein Operon bildet.
Eine MudI Insertionsmutante, ZI349, war weder in aer noch in iut mutiert. Die einzige phänotypische Auswirkung der MudI Insertion war ihr schlechtes Wachstum unter Eisenmangelbedingungen. Die Insertion von MudI führte zu keinem polaren Effekt auf die Expression von iut. Die Restriktionsanalyse ergab, daß die Insertion tatsächlich im Aerobactinsystem, möglicherweise zwischen der Synthese- und der Transportregion lokalisiert ist. Es ist unklar, warum diese Insertion keinen polaren Effekt hervorrief; vielleicht wurde durch die Insertion ein interner Promotor neu geschaffen, der die Wirkung des polaren Effektes abschwächt.
Die ermittelte Restriktionskarte der Aerobactinregion von pColV-K311/11 weist weitgehende Ähnlichkeiten mit den Aerobactinregionen anderer Plasmide, wie z.B. bei pColV-K30 (3,4) oder auch bei FIme Plasmiden von Salmonella (22), und auch mit chromosomal codierten Systemen von E. coli (3) und Shigella (62) auf. Die Bereiche außerhalb der Aerobactinregion variieren allerdings sehr stark. Diese große Ähnlichkeit sogar bei Systemen von verschiedenen Arten weist auf eine verwandtschaftliche Beziehung aller Systeme hin. Da das Aerobactinsystem häufig von konjugativen Plasmiden codiert wird, wo es zudem noch von invers orientierten IS1-Elementen eingerahmt sein kann (22,67,78), ist seine weite Verbreitung innerhalb der Familie der Enterobakterien nicht verwunderlich.

4.2. Klonierung der Aerobactinregion von pColV-K311/11 und Feinanalyse der Syntheseregion

4.2.1. Klonierung der Aerobactinregion

Durch die Klonierung der HindIII Fragmente von pColV-K311/11 in den Vektor pBR322 wurde das Plasmid pRG1 gefunden, das für die gesamte Information des Aerobactinsystems codiert. Zellen mit pRG1 konnten unter Eisenmangelbedingungen auch ohne das Enterochelinsystem wachsen. Die Restriktionsanalyse von pRG1 zeigte außer einem 8,8 Kb großen HindIII Fragment noch ein 45 Kb großes HindIII Fragment, das für das Aerobactinsystem codiert. Bei pColV-K30 ist das Aerobactinsystem auf einem 16,3 Kb großen HindIII Fragment lokalisiert (4).
Der Aerobactinsynthesebereich wurde durch eine EcoRI/HindIII Doppelspaltung von pRG1 subkloniert. Es resultierte der Syntheseklon pRG12, der zwar für die Synthese von Aerobactin, aber nicht mehr für den Rezeptor codiert. Das iut Gen ist auf pRG12 nur unvollständig enthalten, da es wahrscheinlich die EcoRI Schnittstelle von pRG12 überlappt. Auch bei pColV-K30 wurde vermutet, daß diese EcoRI Schnittstelle im iut Gen lokalisiert ist (4,59,60), was durch die Sequenzierung dieses Gens dann auch gezeigt wurde (61).
Bakterien mit pRG12 produzieren unter eisenreichen Bedingungen bereits Aerobactin, die Synthese ließ sich unter eisenarmen Bedingungen aber um das Doppelte steigern. Das bedeutet, daß bei pRG12 auch die Aerobactin Kontrollregion noch erhalten sein muß. Die Produktion von Aerobactin unter eisenreichen Bedingungen liegt

wahrscheinlich an einem Gen-Dosis-Effekt, da pBR322 Derivate in hoher Kopienzahl vorliegen. Für die Kontrolle der Eisenversorgungssysteme von E. coli wird eine negative Regulation durch das fur Genprodukt angenommen (11,44,46). Es ist deshalb leicht vorstellbar, daß die Menge an Repressorprotein in den Zellen nicht ausreicht, um alle Kontrollregionen von auf Multicopy Plasmiden codierten Systemen unter eisenreichen Bedingungen abzudecken.

4.2.2. Feinanalyse der Aerobactinsyntheseregion

Durch die Mutagenese von pRG12 mit Tn1000 und durch Erzeugen von Deletionen nach Spaltung mit Restriktionsenzymen, durch Einwirken der Nuklease Bal31, durch Transformationen mit linearisierter DNA und durch Umklonierungen in verschiedene Vektoren konnten die für die Synthese von Aerobactin verantwortlichen Gene identifiziert werden. Einige dieser Mutanten synthetisierten Zwischenprodukte der Aerobactinbiosynthese, die durch die chemischen Tests auf Hydroxylamin- und Hydroxamatfunktionen gefunden wurden. Durch die chemische Charakterisierung dieser Verbindungen (27) konnte der Biosyntheseweg des Aerobactins ermittelt werden.
Diese Untersuchungen zeigten, daß an der Synthese von Aerobactin vier Gene beteiligt sind. Mutationen im aerA Gen führten dazu, daß weder Aerobactin noch Vorstufen synthetisiert werden konnten. Dieses Gen ist für den ersten Syntheseschritt verantwortlich. Die Kartierung von aerA als letztes der Synthesegene in der Transkriptionsreihenfolge erklärt, warum alle Tn1000 Inserionsmutanten keine Vorstufen von Aerobactin

synthetisieren konnten. Tn1000 hat bei allen Insertionen entweder einen polaren Effekt auf das aerA Gen, oder Tn1000 ist in aerA selbst inseriert; aerA wird also bei allen Insertionen, die zum Verlust der Aerobactinsynthese führten, beeinträchtigt. Polare Effekte von Tn1000 im Aerobactinsystem von pColV-K30 wurden ebenfalls beschrieben (17).

Mutationen im Gen, das für die zweite Synthesereaktion bei der Aerobactinbildung verantwortlich ist und deshalb aerB genannt wurde, führten zur Anhäufung von 6-N-Hydroxylysin. Offensichtlich wird Lysin bei der Aerobactinbiosynthese zunächst an der 6-Aminofunktion hydroxyliert. Diese N-Hydroxylierung von Lysin konnte auch durch einen zellfreien Extrakt von Aerobacter aerogenes 62-1 erreicht werden (72,75). Das aerA Genprodukt muß also eine N-Hydroxylase sein.

Mutationen im dritten Schritt der Aerobactinbiosynthese führten zur Anreicherung der zweiten Vorstufe von Aerobactin, dem 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin. Das 6-N-Hydroxylysin wird also in einem zweiten Schritt vom aerB Genprodukt acetyliert.

Die dritte Reaktion, die Kondensation der nun voll modifizierten Lysinreste mit Citrat wird von zwei Genen vermittelt, von aerD und aerC. Das aerD Genprodukt ist für die peptidische Verknüpfung von 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin mit Citrat verantwortlich. Das aerC Genprodukt schließlich katalysiert die Verknüpfung eines zweiten modifizierten Lysinrestes an das durch die aerD Reaktion entstandene 2-N-Citryl-6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin unter Ausbildung von Aerobactin.

Die Synthesegene sind in folgender Reihenfolge in der Transkriptionsrichtung angeordnet:

aerD aerB aerC aerA

Der Promotor des Aerobactinsystems muß in einem 0,8 Kb großen HindIII/SalI Fragment ganz am linken Ende der klonierten Sequenz von pRG12 lokalisiert sein, denn die Deletion dieses Fragmentes führte zur vollständigen Abschaltung des Systems. Dies ist ein weiterer Beweis für die mit Hilfe der Mudl Phagen ermittelte Transkriptionsrichtung und für die Operonstruktur des Aerobactinsystems.
Die Anordnung der Synthesegene wurde durch Komplementationsversuche bestätigt. Hierbei konnten die Tn1000 Insertionsplasmide Funktionen "upstream" der Insertionsstelle komplementieren, Funktionen "downstream" der Insertionsstelle dagegen nicht oder nur sehr schlecht. Warum "downstream" gelegene Funktionen überhaupt komplementiert werden konnten, ist schwer zu verstehen, da die aerA Funktion durch den polaren Effekt so stark beeinträchtigt wurde, daß keine Zwischenprodukte nachweisbar waren. Möglicherweise reicht bei anderen Reaktionen weniger Genprodukt aus, um die Enzymaktivität nachweisen zu können.

Durch die Analyse der Expression dieser Plasmide in E. coli Minizellen konnten den Genloci drei Genprodukte zugewiesen werden:
Das aerD Gen codiert für ein 60 Kd großes Protein und das aerB Gen für ein 35 Kd großes Protein. Dem aerC Locus konnte kein Protein zugeordnet werden. Das aerA Gen codiert wahrscheinlich für ein 50 Kd großes Protein, denn alle Mutationen, die zur Inaktivierung des aerA Gens führten, hatten auch den Verlust des 50 Kd Proteins zur Folge. Auch bei pCo1V-K30 ist dieses Protein an der Synthese beteiligt (17). Doch wurde dieses Protein bei pCo1V-K30 auch mit einer Transportfunktion in

Verbindung gebracht (59). Da es nur schwer vorstellbar ist, daß ein Protein zugleich an der Synthese und dem Transport von Aerobactin beteiligt sein soll, wurden die Experimente mit pColV-K30, die zur Aufstellung der Transporthypothese führten, wiederholt (27). Dabei zeigte sich, daß das 50 Kd Protein nicht am Transport von Aerobactin beteiligt ist. Für den Transport ist von den plasmidcodierten Funktionen lediglich der Rezeptor Iut nötig (27).
Das 50 Kd Protein stellt damit sehr wahrscheinlich das aerA Genprodukt, die N-Hydroxylase, dar.
Die beiden 60 Kd und 35 Kd großen Proteine von pColV-K311/11 wurden in derselben Anordnung auch bei pColV-K30 gefunden (17). Dem bei pColV-K311/11 mit aerC bezeichneten Genlocus wurde bei pColV-K30 ein 45 Kd großes Protein zugeordnet (17). Ein Protein dieser Größe ist auch bei vielen in dieser Arbeit vorgestellten Plasmiden sichtbar. Dieses Protein kann aber keinem Genlocus zugeordnet werden, da z.B. alle Tn1000 Insertionen, auch die in aerC inserierten Transposonen, die Synthese dieses Proteins nicht beeinträchtigen.
Es ist denkbar, daß sich unter dem 45 Kb großen Protein noch ein zweites gleich großes Protein verbirgt, das dann aber nicht zu identifizieren wäre.
Außerdem ist zu bedenken, daß manche Proteine sehr schnell nach ihrer Synthese wieder proteolytisch abgebaut werden, sodaß ihr Nachweis sehr schwierig ist. Auch dies könnte beim aerC Genprodukt der Fall sein.

Das aerD Gen scheint von den Synthesegenen am stärksten exprimiert zu werden, denn das 60 Kd Protein ist immer sehr deutlich sichtbar. Das nachfolgende aerB Gen wird sehr viel schlechter exprimiert. Nur bei einem Plasmid, das nur noch den aerB Bereich besitzt, ist das 35 Kd große aerB Genprodukt wirklich deutlich zu sehen. Besser exprimiert wird dagegen das in der Transkriptionsreihenfolge weiter hinten liegende aerA Gen. Das 50 Kd Protein ist meist recht gut sichtbar. Möglicherweise

ist vor diesem Gen ein schwacher interner Promotor lokalisiert, der zu einer besseren Expression des Gens verhilft. Dieser Promotor wäre dann aber so schwach, daß bei Plasmiden ohne den Hauptpromotor des Aerobactinsystems die Enzymaktivität der N-Hydroxylase durch den chemischen Test auf Vorstufen von Aerobactin nicht nachweisbar ist; lediglich durch den sehr viel empfindlicheren Nachweis über die radioaktive Markierung der Genprodukte ist das Enzym zu entdecken. Auch bei pCoIV-K30 wurde vermutet, daß vor dem Gen des 50 Kd Proteins ein interner Promotor lokalisiert sein könnte (17,59). Sehr stark exprimiert wird auch der Rest des iut Gens. Das verkürzte 27 Kd große Teilpeptid von Iut ist bei pRG13 und bei pRG131 so stark markiert wie das in der Transkriptionsreihenfolge erste Gen des Aerobactinsystems, das aerD Gen. Auch hier könnte ein interner Promotor vor iut als Ursache für die sehr starke Expression vermutet werden, der zu einer konstitutiven Expression des Rezeptorgens führt. Es konnte gezeigt werden, daß in diesem Bereich kein eisenregulierter Promotor lokalisiert ist (59). Diese konstitutive Expression des Rezeptorgens wäre biologisch sinnvoll, denn es könnte im Medium vorhandenes Aerobactin verwertet werden, ohne daß der gesamte Aerobactinkomplex mit den energieaufwendigen Synthesefunktionen eingeschaltet werden müßte.
Zu beachten ist bei diesen Interpretationen, daß die Genexpression in Minizellen nicht die "in vivo" Verhältnisse wiederspiegeln muß.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aerobactinregion von pCoIV-K311/11 konnte durch die Restriktionsanalyse von Tn*5*-, Mud1- und einer Deletionsmutanten auf dem Plasmid lokalisiert werden. Es konnte eine Restriktionskarte der Region erstellt und die Aerobactin Synthese- und Transportbereiche kartiert werden. Außerdem konnte durch die Restriktionsanalyse der Mud1 Insertionen die Transkriptionsrichtung an verschiedenen Stellen des Systems ermittelt werden. Die Richtung der Transkription ist im gesamten System gleich und verläuft vom Synthese- hin zum Transportbereich.

Die gesamte Aerobactinregion wurde in das Vektorplasmid pBR322 kloniert. Mit einem Subklon, der nur die für die Aerobactinsynthese nötige Information enthält, wurde die Syntheseregion charakterisiert. Durch Mutagenese mit Tn*1000* und durch Erzeugen von Deletionen konnten vier an der Synthese von Aerobactin beteiligte Genloci identifiziert werden. Aufgrund der Anreicherung von Vorstufen der Aerobatinbiosynthese bei Mutanten konnte gezeigt werden, daß Lysin zunächst vom *aerA* Genprodukt an der 6-Aminofunktion hydroxyliert wird. Das *aerB* Genprodukt katalysiert dann eine N-Acetylierung unter Ausbildung von 6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin. Diese Substanz wird dann vom *aerD* Genprodukt an der 2-Aminofunktion mit Citrat verbunden, wobei 2-N-Citryl-6-N-Acetyl-6-N-Hydroxylysin entsteht. Das *aerC* Genprodukt knüpft nun die zweite Peptdibindung unter Freisetzung von Aerobactin.

Die Kartierung der Mutationen durch Restriktionsanalysen ergab die Genanordnung der Aerobactinsynthesegene. Sie

lautet in der Transkriptionsreihenfolge:

aerD aerB aerC aerA

Der Promotor des Systems wurde links von aerD in einem 0,8 Kb großen HindIII/SalI Fragment lokalisiert.

Durch die Analyse der Genexpression in Minizellen konnten die Genprodukte von drei Synthesegenen identifiziert werden. Das aerD Gen codiert für ein 60 Kd großes Protein und die Gene aerB und aerA für ein 35 Kd bzw. 50 Kd großes Protein. Dem aerC Gen konnte kein Genprodukt zugeordnet werden.

6. ANHANG

Untersuchung von verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den eisenregulierten äußeren Membranproteinen Iut, FhuA und FhuE

Die am Eisentransport beteiligten Rezeptoren der äußeren Membran Iut, FhuA und FhuE von *E. coli* haben nicht nur eine sehr ähnliche Funktion beim Transport von Eisenkomplexbildnern des Hydroxamsäure-Typs, sie weisen auch ein sehr ähnliches Molekulargewicht auf, Iut mit 74 Kd, FhuE mit 76 Kd und FhuA mit 78 Kd. Es ist denkbar, daß diese Proteine aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind. Wäre dies der Fall, müßten sich auf der DNA Ebene nachweisbare Homologien in der Nukleotidsequenz erhalten haben.
Zur Untersuchung solcher Homologien wurde das Plasmid pFB103-1, das für FhuA codiert (28), durch Nick-Translation radioaktiv markiert und mit Southern Blots von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proben von Plasmiden, die für Iut und FhuE codieren, und von chromosomaler DNA hybridisiert.
Das Plasmid, das für FhuE codiert, wurde von K. Hantke zur Verfügung gestellt. Da von diesem Plasmid noch keine Karte vorlag, mußte zunächst eine Restriktionsanalyse durchgeführt werden (Abb. 26). Durch Erzeugen von Deletionen wurde das *fhuE* Gen auf einem etwa 2,8 Kb großen *Pvu*II Fragment von pKH1 lokalisiert.
Bei allen Hybridisierungsansätzen mit den klonierten Rezeptorgenen hybridisierten nur die homologen Bereiche der Vektorplasmide miteinander. Bei der mit *Bam*HI geschnittenen chromosomalen DNA wurde eine Bande von ungefähr 8 bis 10 Kb Größe markiert. Gelegentlich war

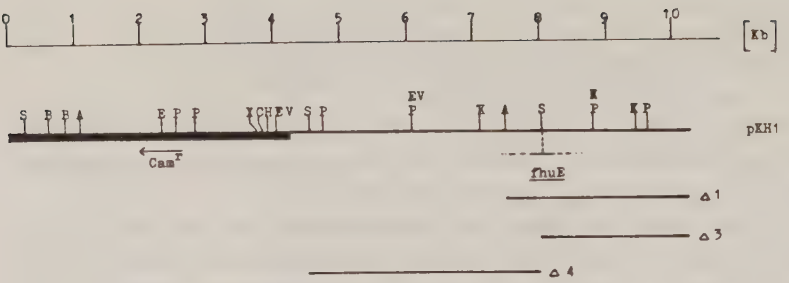


Abb. 26: Restriktionskarte von pKH1. Die Vektor DNA von pACYC184 ist als dicker Balken eingezeichnet. Die Markierungen unter pKH1 geben die Deletionen an, die zur Lokalisierung von fhuE gemacht wurden. Der ungefähre Bereich von fhuE ist eingezeichnet. Restriktionsenzyme: A,AvaI; B,BglI; C,ClaI; E,EcoRI; EV,EcoRV; H,HindIII; K,KpnI; P,PvuII; S,SalI; X,XbaI.

auch eine sehr große Bande markiert. Dies könnte durch eine unvollständige Spaltung der chromosomalen DNA erklärt werden.

Auch unter weniger strengen Bedingungen, bei denen eine Fehlpaarung bis zu 30% zugelassen wurde, konnte keine Hybridisierung von fhuA mit iut oder fhuE beobachtet werden.

Diese Ergebnisse bedeuten, daß bei diesen Genen vorhandene Homologien sich nicht über große Bereiche der Gene erstrecken können. Es ist aber denkbar, daß es kleinere homologe Bereiche gibt, die für die Domänen der Proteine codieren, welche für die ähnlichen Funktionen verantwortlich sind.

Diese Bereiche müßten aber unter anderen Versuchsbedingungen oder durch Sequenzierung ermittelt werden.

7. LITERATUR

1. Archibald, F. (1983) Lactobacillus plantarum, an organism not requiring iron. FEMS Microbiol. Lett. 19, 29-32
2. Bindereif, A., Braun, V., Hantke, K. (1982) The cloacin receptor of ColV-bearing Escherichia coli is part of the Fe^{3+}-aerobactin transport system. J. Bacteriol. 150, 1472-1475
3. Bindereif, A., Neilands, J.B. (1985) Aerobactin genes in clinical isolates of Escherichia coli. J. Bacteriol. 161, 727-735
4. Bindereif, A., Neilands, J.B. (1983) Cloning of the aerobactin-mediated iron assimilation system of plasmid ColV. J. Bacteriol. 153, 1111-1113
5. Binns, M.M., Davies, D.C., Hardy, K.G. (1979) Cloned fragments of the plasmid ColV,I-K94 specifying virulence and serum resistance. Nature 279, 778-781
6. Binns, M.M., Mayden, J., Levine, R.P. (1982) Further characterization of complement resistance confered on Escherichia coli by the plasmid genes traT of R100 and iss of ColV,I-K94. Infect. Immun. 35, 654-659
7. Birnboim, H.C. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA, in: Methods in enzymology, Volume 100 (Wu, R., Grossman, L., Moldave, K., eds.), Academic Press, New York, pp. 95-163
8. Bolivar, F. (1978) Derivatives of pBR322 in genetic engeneering, in: Molecular cloning vectors (Boyer, H.W., Nicosia, S., eds.), Biomedical Press, Elsevier, North Holland, Amsterdam and New York, pp. 95-163
9. Braun, V. (1981) Escherichia coli cells containing the plasmid ColV produce the iron ionophore aerobactin. FEMS Microbiol. Lett. 11, 225-228
10. Braun, V., Brazel-Faisst, C., Schneider, R. (1984) Growth stimulation of Escherichia coli in serum by iron(III) aerobactin. Recycling of aerobactin. FEMS Microbiol. Lett. 21, 99-103

11. Braun, V., Burkhardt, R. (1982) Regulation of the ColV plasmid-determined iron(III)-aerobactin-transport system in Escherichia coli. J. Bacteriol. 152, 223-231
12. Braun, V., Burkhardt, R., Schneider, R., Zimmermann, L. (1982) Chromosomal genes for ColV plasmid-determined Fe^{3+}-aerobactin transport in Escherichia coli. J. Bacteriol. 152, 553-559
13. Braun, V., Gross, R., Köster, W., Zimmermann, L. (1983) Plasmid and chromosomal mutants in the iron(III)-aerobactin transport system of Escherichia coli. Use of streptonigrin for selection. Mol. Gen. Genet. 192, 131-139
14. Braun, V., Hantke, K. (1982) Receptor-dependent transport systems in Escherichia coli for iron complexes and vitamin B12, in: Membranes and Transport, Volume 2 (Martonosi, A.N., ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 107-113
15. Braun, V., Hancock, R.E.W., Hantke, K., Hartmann, A. (1976) Functional organization of the outer membrane of Escherichia coli: phage and colicin receptors as components of iron uptake systems. J. Supramol. Struct. 5, 37-58
16. Braun, V., Schaller, K., Wolff, H. (1973) A common receptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of Escherichia coli B. Biochim. Biophys. Acta 323, 87-97
17. Carbonetti, N.H., Williams, P.H. (1984) A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid ColV-K30. Infect. Immun. 46, 7-12
18. Casadaban, M.J., Cohen, S.N. (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: In vivo probe for transcriptional control sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4530-4533
19. Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic mini plasmid. J. Bacteriol. 134, 1141-1156

20. Clewell, D.B., Helinski, D.R. (1969) Supercoiled circular DNA-protein complex in Escherichia coli: purification and induced conversion to an open circular DNA form. Proc. Natl. Acad. Sci USA 62, 1159-1166
21. Coderre, P.E., Earhart, C.F. (1984) Characterization of a plasmid carrying the Escherichia coli K-12 entD, fepA, fes and entF gense. FEMS Microbiol. Lett. 25, 111-116
22. Colonna, B., Nicoletti, M., Visca, P., Casalino, M., Valenti, P., Maimone, F. (1985) Composite IS1 elements encoding hydroxamate-mediated iron uptake in FIme plasmids from epidemic Salmonella spp. J. Bacteriol. 162, 307-316
23. Crosa, J.H. (1984) The relationship of plasmid-mediated iron transport and bacterial virulence. Ann. Rev. Microbiol. 38, 69-89
24. Csáky, T. (1948) On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. Acta. Chem. Scand. 2, 450-454
25. Dagert, M., Ehrlich, S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. Gene 6, 23-28
26. DeGraaf, F.K., Klaasen-Boor, P. (1977) Purification and characterization of a complex between Cloacin and its immunity protein isolated from Enterobacter cloacae (Clo DF13). Eur. J. Biochem. 73, 107-114
27. Engelbrecht, F. (1985) Dissertation, Universität Tübingen
28. Fecker, L., Braun, V. (1983) Cloning and expression of the fhu genes involved in the iron(III)-hydroxamate uptake by Escherichia coli. J. Bacteriol. 156, 1301-1314
29. Finkelstein, R.A., Yancey, R.J. (1981) Effect of siderophores on virulence of Neisseria gonorrhoeae. Infect. Immun. 32, 609-613

30. Fleming, T.P., Schrodt Nahlik, M., Neilands, J.B., McIntosh, M.A. (1985) Physical and genetic characterization of cloned enterobactin genomic sequences from Escherichia coli K-12. Gene 34, 47-54
31. Frost, G., Rosenberg, H. (1973) The inducible citrate-dependent iron transport system in Escherichia coli K-12. Biochim. Biophys. Acta 330, 90-101
32. Frost, G., Rosenberg, H. (1975) Relationship between the tonB locus and iron transport in Escherichia coli. J. Bacteriol. 124, 704-712
33. Gibson, F., Magrath, D.J. (1969) The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by Aerobacter aerogenes 62-1. Biochim. Biophys. Acta 192, 175-184
34. Greenwood, K.T., Luke, R.K.J. (1978) Enzymatic hydrolysis of enterochelin and its iron complex in Escherichia coli K-12. Biochim. Biophys. Acta 525, 209-218
35. Grewal, K.K., Warner, P.J., Williams, P.H. (1982) An inducible outer membrane protein involved in aerobactin-mediated iron transport by ColV strains of Escherichia coli. FEBS Lett. 140, 27-30
36. Griffiths, E., Rogers, H.J., Bullen, J.J. (1980) Iron, plasmids and infection. Nature 284, 508-509
37. Griffiths, E. (1983) Availability of iron and survival of bacteria in infection. Med. Microbiol. 3, 153-177
38. Gross, R. (1982) Diplomarbeit, Universität Tübingen
39. Gross, R., Engelbrecht, F., Braun, V. (1984) Genetic and biochemical characterization of the aerobactin synthesis operon on pColV. Mol. Gen. Genet. 196, 74-80
40. Guyer, M.S. (1978) The $\gamma\delta$ sequence of F is an insertion sequence. J. Mol. Biol. 126, 347-365
41. Guyer, M.S. (1983) Uses of transposon $\gamma\delta$ in the analysis of cloned genes, in: Methods in enzymology, Volume 101 (Wu, R., Grossman, L., Moldave, L., eds.), Academic Press, New York, pp. 362-369

42. Hancock, R.E.W., Braun, V. (1976) Nature of the energy requirement for the irreversible adsorption of bacteriophages T1 and Ø80 to Escherichia coli. J. Bacteriol. 125, 409-415
43. Hancock, R.E.W., Hantke, K., Braun, V. (1976) Iron transport in Escherichia coli K-12: involvement of the colicin B receptor and of a citrate-inducible protein. J. Bacteriol. 127, 1370-1375
44. Hantke, K. (1981) Regulation of ferric iron transport in Escherichia coli K-12: isolation of a constitutive mutant. Mol. Gen. Genet. 182, 288-292
45. Hantke, K. (1983) Identification of an iron uptake system specific for coprogen and rhodotorulic acid in Escherichia coli K-12. Mol. Gen. Genet. 191, 301-306
46. Hantke, K. (1984) Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in Escherichia coli K-12. Mol. Gen. Genet. 197, 337-341
47. Hantke, K., Braun, V. (1975) Membrane receptor dependent iron transport in Escherichia coli. FEBS Lett. 49, 301-305
48. Hantke, K., Zimmermann, L. (1981) The importance of the exbB gene for vitamin B12 and ferric iron transport. FEMS Microbiol. Lett. 12, 31-35
49. Harris, W.R., Carrano, C.J., Raymond, K.N. (1979) Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. Isolation, characterization and formation constants of ferric aerobactin. J. Amer. Chem. Soc. 101, 2722-2727
50. Hartmann, A., Fiedler, H.-P., Braun, V. (1979) Uptake and conversion of the antibiotic albomycin by Escherichia coli K-12. Eur. J. Biochem. 99, 517-524

51. Hedgpeth, J., Goodman, H.M., Boyer, H.W. (1972) DNA nucleotide sequence restricted by the RI endonuclease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3448-3452
52. Humphreys, G.O., Willshaw, G.A., Anderson, E.S. (1975) A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA. Biochim. Biophys. Acta 383, 457-463
53. Hussein, S., Hantke, K., Braun, V. (1981) Citrate-dependent iron transport system in Escherichia coli K-12. Eur. J. Biochem. 117, 431-437
54. Ichihara, S., Mizushima, S. (1978) Identification of an outer membrane protein responsible for the binding of the Fe-enterochelin complex to Escherichia coli cells. J. Biochem. 83, 137-140
55. Jorgensen, R.A., Reznikoff, W.S. (1979) Organization of structural and regulatory genes that mediate tetracycline resistance in transposon Tn10. J. Bacteriol. 138, 705-714
56. Kadner, R.J., Heller, K., Coulton, J.W., Braun, V. (1980) Genetic control of hydroxamate-mediated iron uptake in Escherichia coli. J. Bacteriol. 143, 256-264
57. Konopka, K., Bindereif, A., Neilands, J.B. (1982) Aerobactin-mediated utilization of transferrin iron. Biochemistry 21, 6503-6508
58. Konopka, K., Neilands, J.B. (1984) Effect of serum albumin on siderophore-mediated utilization of transferrin iron. Biochemistry 23, 2122-2127
59. Krone, W.J.A., Luirink, J., Koningstein, G., Oudega, B., deGraaf, F.K. (1983) Subcloning of the cloacin DF13/aerobactin receptor protein and identification of a pColV-K30 determined polypeptide in ferric-aerobactin uptake. J. Bacteriol. 156, 945-948

60. Krone, W.J.A., Oudega, B., Stegehuis, F., deGraaf, F.K. (1983) Cloning an expression of the cloacin DF13/aerobactin receptor of Escherichia coli (ColV-K30). J. Bacteriol. 153, 716-721
61. Krone, W.J.A., Stegehuis, F., Konongstein, G., van Doorn, C., Roosendaal, B., deGraaf, F.K., Oudega, B. (1985) Characterization of the pColV-K30 encoded cloacin DF13/aerobactin outer membrane receptor protein of Escherichia coli; isolation and purification of the protein and analysis of its nucleotide sequence and primary structure. FEMS Microbiol. Lett. 26, 153-161
62. Lawlor, K.M., Payne, S.M. (1984) Aerobactin genes in Shigella spp. J. Bacteriol. 160, 266-272
63. Legerski, R.J., Hodnett, J.L., Gray, H.B. (1978) Extracellular nucleases of Pseudomonas BAL31. Use of double-strand deoxyriboexonuclease activity as the basis of a convenient method for the mapping of fragments of DNA produced by cleavage with restriction enzymes. Nuc. Ac. Res. 5, 1445-1492
64. Letendre, E.D. (1985) The importance of iron in the pathogenesis of infection an neoplasia. TIBS 11, 166-168
65. Lugtenberg, B., Neijers, J., Peters, R., van der Hock, P., van Alphen, L. (1975) Electrophoretic resolution of the "major outer membrane proteins" of Escherichia coli K-12 into four bands. FEBS Lett. 58, 254-258
66. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory
67. McDougall, S., Neilands, J.B. (1984) Plasmid- and chromosome-coded aerobactin synthesis in enteric bacteria: insertion sequences flank operon in plasmid-mediated systems. J. Bacteriol. 159, 300-305

68. McIntosh, M.A., Chenault, S.S., Earhart, C.F. (1979) Genetic and physiological studies in the relationship between colicin B resistance and ferrienterochelin uptake in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 137, 653-657

69. Meagher, R.B., Tait, R.C., Betlach, M., Boyer, H.W. (1977) Protein expression in Escherichia coli minicells by recombinant plasmids. Cell 10, 521-536

70. Moore, D.G., Earhart, C.F. (1981) Specific inhibition of Escherichia coli ferrienterochelin uptake by a normal serum immunoglobulin. Infect. Immun. 31, 631-635

71. Moore, D.G., Yancey, R.J., Lankford, C.E., Earhart, C.F. (1980) Bacteriostatic enterochelin-specific immunoglobulin from normal human serum. Infect. Immun. 27, 418-423

72. Murray, G.J., Clark, G.E.D., Parniak, M.A., Viswanatha, T. (1977) Effect of metabolites on ε-N-hydroxylysine formation in cell-free extracts of Aerobacter aerogenes 62-1. Can. J. Biochem. 55, 625-629

73. Neilands, J.B. (1982) Microbial envelope proteins related to iron. Ann. Rev. Microbiol. 36, 285-309

74. O'Connor, M.B., Malamy, M.H. (1983) A new insertion sequence, IS21, is found on the Mud1(Ap,lac)bacteriophage and the Escherichia coli K-12 chromosome. J. Bacteriol. 156, 669-679

75. Parniak, M.A., Jackson, G.E.D., Murray, G.J., Viswanatha, T. (1979) Studies in the formation of N^6-hydroxylysine in cell-free extracts of Aerobacter aerogenes 62-1. Biochim. Biophys. Acta 569, 99-108

76. Payne. S.M. (1980) Synthesis and utilization of siderophores by Shigella flexneri. J. Bacteriol. 143, 1420-1424

77. Payne, S.M., Niesel, D.W., Peixotto, S.S., Lawlor, K.M. (1983) Expression of hydroxamate and phenolate siderophores by Shigella flexneri. J. Bacteriol. 155, 949-955
78. Perez-Casal, J.F., Crosa, J.H. (1984) Aerobactin iron uptake sequences in plasmid ColV-K30 are flanked by inverted IS1-like elements and replication origins. J. Bacteriol. 160, 256-265
79. Pickett, C.L., Hayes, L., Earhart, C.F. (1984) Molecular cloning of the Escherichia coli K-12 entACGBE genes. FEMS Microbiol. Lett. 24, 77-80
80. Pugsley, A.P., Reeves, P. (1976) Iron uptake in colicin B-resistant mutants of Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 126, 1052-1062
81. Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113, 237-251
82. Rothstein, S.J., Jorgensen, R.A., Postle, K., Reznikoff, W.S. (1980) The inverted repeats of Tn5 are functionally different. Cell 19, 795-805
83. Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F., Peterson, G.B. (1982) Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. J. Mol. Biol. 162, 729-773
84. Schneider, R., Hartmann, A., Braun, V. (1981) Transport of the iron ionophore ferrichrome in Escherichia coli K-12 and Salmonella typhimurium LT2. FEMS Microbiol. Lett. 11, 115-119
85. Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517
86. Spiro, T.G., Saltman, P. (1969) Polynuclear complexes of iron and their biological implications. Struct. Bonding 6, 116-156

87. Stuart, S.J., Greenwood, K.T., Luke, R.K.J. (1980) Hydroxamate-mediated transport of iron controlled by ColV plasmids. J. Bacteriol. 143, 35-42
88. Stuart, S.J., Greenwood, K.T., Luke, R.K.J. (1982) Iron-suppressible production of hydroxamate by Escherichia coli isolates. Infect. Immun. 36, 870-875
89. Van Tiel-Menkveld, G., Mentjox-Vervuurt, J.M., Oudega, B., deGraaf, F.K. (1982) Siderophore production by Enterobacter cloacae and a common receptor protein for the uptake of aerobactin and cloacin DF13. J. Bacteriol. 150, 490-497
90. Van Tiel-Menkveld, G., Oudega, B., Kempers, O., deGraaf, F.K. (1981) The possible involvement of the cloacin DF13 receptor protein in the hydroxamate-mediated uptake of iron by Enterobacter cloacae and Escherichia coli (ColV). FEMS Microbiol. Lett. 12, 373-380
91. Viera, J., Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19, 259-268
92. Wagegg, W., Braun, V. (1981) Ferric citrate transport in Escherichia coli requires outer membrane protein FecA. J. Bacteriol. 145, 156-163
93. Wahl, G.M., Stern, M., Stark, G.R. (1979) Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3683-3687
94. Warner, P.J., Williams, P.H., Bindereif, A., Neilands, J.B. (1981) ColV plasmid-specified aerobactin synthesis by invasive strains of Escherichia coli. Infect. Immun. 33, 540-545

95. Wayne, R., Frick, K., Neilands, J.B. (1976) Siderophore protection against colicins M,B,V and Ia in Escherichia coli. J. Bacteriol. 126, 7-12
96. Wayne, R., Neilands, J.B. (1975) Evidence for common binding sites for ferrichrome compounds and bacteriophage Ø80 in the cell envelope of Escherichia coli. J. Bacteriol. 121, 497-503
97. Weinberg, E.D. (1984) Iron withholding: A defense against infection and neoplasia. Phys. Rev. 64, 65-102
98. Williams, P.H. (1979) Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of Escherichia coli. Infect. Immun. 26, 925-932
99. Williams, P.H., Warner, P.J. (1980) ColV plasmid-mediated, colicin V independent iron uptake system of invasive strains of Escherichia coli. Infect. Immun. 29, 411-416
100. Wookey, P., Hussein, S., Braun, V. (1981) Functions in outer and inner membrane of Escherichia coli for ferrichrome transport. J. Bacteriol. 146, 1158-1161
101. Wookey, P., Rosenberg, H. (1978) Involvement of inner and outer membrane components in the transport of iron and in colicin B action in Escherichia coli. J. Bacteriol. 133, 661-666
102. Zimmermann, L., Hantke, K., Braun, V. (1984) Exogenous induction of the iron dicitrate transport system of Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 159, 271-277

Lebenslauf

1956,	am 11. Oktober in Mietingen geboren;
1962	Besuch der Grundschule in Reutlingen;
1966	Eintritt in das Friedrich-List-Gymnasium in Reutlingen;
1975,	am 30. Mai Abitur am Friedrich-List-Gymnasium in Reutlingen;
1975/76	Zivildienst;
1976	im Wintersemester Studienbeginn an der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen;
1978,	am 18. Oktober Diplomvorprüfung in Biologie;
1982,	am 14. Juli Diplomhauptprüfung in Biologie, Hauptfach Mikrobiologie. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie II, Universität Tübingen, mit dem Titel: Restriktionsanalyse eines Eisenversorgungselementes auf dem Plasmid ColV-K311/11 von Escherichia coli;
August 1982 bis Juli 1985	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. V. Braun.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, F.W. Bentrup, W. Bessler, V. Braun, D. Bunke, H. Frank, K.G. Grell, J. Guglielmi, K.-P. Hadeler, A. Hager, K. Hantke, V. Hemleben, U. Henning, G. Jung, E. Kulzer, P. Lange, W. Löffler, D. Mecke, C. Meier-Brook, G.F. Meyer, F. Möhres, W. Nakel, F. Oberwinkler, K. Pelling, K. Poralla, H. Probst, W. Rähle, A. Rieker, E. Sander, H. Schwarz, B. Schwemmle, H. Seiler, W. Seyffert, D. Sperlich, J. Strähle, G. Weitzel, P. Wenk, K. Wöhrmann, H. Zähner